

Der Einfluß von Narkose,  
Temperatur und Sauerstoff  
auf das Verhalten hypoxischer Zellen  
des Fibrosarkoms SSK 2 der Maus  
unter besonderer Berücksichtigung  
des PLD-Effekts

Eva Hofner







Der Einfluß von Narkose, Temperatur und Sauerstoff auf  
das Verhalten hypoxischer Zellen des Fibrosarkoms SSK 2  
der Maus unter besonderer Berücksichtigung des PLD-Effekts

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilian-Universität München

vorgelegt von  
Eva Hofner  
aus München

1986

1. Berichterstatter: Herr Prof. Hagen

2. Berichterstatter: Herr Prof. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 23.09.1986

## Gliederung

### 1. Einleitung

### 2. Material und Methoden

- 2.1. Tierstamm
- 2.2. Tumor
- 2.3. Transplantation des Tumors
- 2.4. Stammzellen, Feederzellen
- 2.5. Passage
- 2.6. Färbemethode
- 2.8. Bestrahlungen
- 2.9. Narkose
- 2.10. Versuche mit verschiedenen Gasgemischen
- 2.11. Temperaturversuche
- 2.12. Reoxygenierung
- 2.13. Chemikalien
- 2.14. in vivo-in vitro Methode - Optimierungsversuche
  - 2.14.1. Zellausbeute
  - 2.14.2. Plating efficiency (PE) - Feederzellen
    - 2.14.2.1. Alte - neue Passage
    - 2.14.2.2. Mediumwechsel
    - 2.14.2.3. Anzahl der Feederzellen

### 3. Hauptversuche

- 3.1. Dosiseffektkurven in vitro
- 3.2. Dosiseffektkurven in vivo, hypoxisch
- 3.3. Dosiseffektkurven in vivo, ambient
- 3.4. Einfluß der Narkose auf die hypoxische Fraktion

- 3.5. Einfluß der Temperatur auf die hypoxische Fraktion
- 3.6. Einfluß der Sauerstoffkonzentration der Atemluft auf die hypoxische Fraktion
- 3.7. Reoxygenierung
- 3.8. Einfluß der Dauer, die bestrahlte Zellen im Tumor vor Explantation verweilen (operationell als PLD-Repair definiert)

#### 4. Diskussion

- 4.1. Sauerstoffeffekt
  - 4.1.1. Historische Versuche
  - 4.1.2. K-Wert, Abhängigkeit des Sauerstoffeffekts von der Sauerstoffkonzentration
  - 4.1.3. Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck
  - 4.1.4. Zeitabhängigkeit
  - 4.1.5. Stoffwechselabhängigkeit
  - 4.1.6. Mechanismus
  - 4.1.7. Proliferation von Zellen nach Hypoxie
- 4.2. Hypoxie in Tumoren
  - 4.2.1. Einfluß physiologischer Faktoren
    - 4.2.1.1. Temperatur
    - 4.2.1.2. Narkose
    - 4.2.1.3. Sauerstoffsättigung
- 4.3. Reoxygenierung
- 4.4. PLD-Repair
  - 4.4.1. PLD-Repair und Zeitabhängigkeit
  - 4.4.2. PLD-Repair und Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck
  - 4.4.3. PLD-Repair und Dosisabhängigkeit

4.4.4. Mechanismus

4.5. Hypoxie bei menschlichen Tumoren

5. Zusammenfassung

6. Literatur



## 1. Einleitung

Die Strahlentherapie ist eine der wichtigsten Faktoren in der Behandlung maligner Erkrankungen. Für eine möglichst effektive Therapie ist die genaue Kenntnis über die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Zellen des Tumors und des umgebenden Normalgewebes unerlässlich.

Bereits 1956 konnte eine quantitative Beziehung zwischen Überlebensrate von Säugetierzellen und Größe der verabreichten Dosis festgestellt werden (Puck et al., 1956).

Die ermittelten, sogenannten Dosiseffektkurven beruhen auf Versuchen mit in vitro kultivierten Zellen.

Alle bisher im Tierexperiment unter Einfluß locker ionisierender Strahlung gefundenen Dosiseffektkurven zeigen einen sigmoidalen Verlauf; im halblogarithmischen Maßstab haben sie die Form einer 'Schulterkurve'. Die Steilheit der Kurven wird durch bestimmte Faktoren stark beeinflusst.

Eine besonders wichtige Bedeutung hat dabei der Sauerstoffgehalt. Seine dosismodifizierende Wirkung wurde schon sehr früh beobachtet (Schwarz, 1909; Holthusen, 1921; Mottram, 1936) und auch an Säugetierzellen nachgewiesen (Gray, 1953). Zellen, denen kein Sauerstoff zur Verfügung steht, sogenannte anoxische Zellen, zeigen sich 2 - 3mal so resistent gegenüber ionisierender Strahlung wie gut mit Sauerstoff versorgte (sogenannte euoxische Zellen). Diesen Faktor bezeichnet man als "Sauerstoffeffekt", bzw. OER (oxygen enhancement ratio). Zellen, die nur sehr wenig Sauerstoff erhalten, die hypoxischen Zellen, zeigen einen Sauerstoffeffekt, der geringer ist als unter euoxischen Bedingungen.

Der dosismodifizierende Faktor des Sauerstoffeffekts kann berechnet werden aus dem Verhältnis gleich wirksamer Strahlendosen unter verschiedenen Strahlungsbedingungen. Für die Strahlentherapie sind die hypoxischen und die anoxischen Zellen von großer Bedeutung. Die meisten

soliden Tumoren haben Bereiche, in denen Zellen gar nicht oder unzureichend mit Sauerstoff versorgt sind. Will man einen möglichst großen Prozentsatz an Tumorzellen durch Strahlung abtöten, müßten, bedingt durch die Anwesenheit anoxischer und hypoxischer Zellen, die Dosen sehr hoch gewählt werden, was zu Nebenwirkungen in den Normalgeweben führt.

Man bestrahlt in der Praxis deshalb fraktioniert, d. h. mehrere kleine Dosen werden innerhalb zeitlicher Intervalle verabreicht. Man versucht, mit der ersten Dosis alle euoxischen Zellen abzutöten. Danach steht häufig den hypoxischen Zellen mehr Sauerstoff zur Verfügung und diese Zellen können nun wieder proliferieren und wären für erneutes Tumorstadium verantwortlich. Wird nun zum zweiten Mal bestrahlt, können diese Zellen mit niedriger Dosis abgetötet werden, da sie sich jetzt wie oxygenierte Zellen verhalten. Ein solches Verhalten wird mit Reoxygenierung bezeichnet.

Für eine optimale fraktionierte Behandlung wäre es nun wichtig, den Umfang der hypoxischen Fraktion in einem Tumor zu kennen sowie die Faktoren, von denen er abhängt. Die vorliegende Arbeit soll zur Aufklärung dieses Problems beitragen.

Die Zellen wurden mit der sog. in vivo-in vitro Methode untersucht: Der Tumor wird dabei im Tier bestrahlt, nach Exzision eine Zellkultur angelegt und anhand der entstandenen Zellkolonien die Überlebensrate der Zellen bestimmt. Diese Methode ist allerdings nur bei einer kleinen Anzahl von Tumoren möglich, bei denen Zellkulturen in vitro gelingen, unter anderem auch beim SSK 2-Fibrosarkom. Mit der in vivo-in vitro Methode hat man eine Methode zur Verfügung, um Zellen im Tier, d. h. in ihrer gewohnten Umgebung zu behandeln, und trotzdem die Reaktion anhand von Einzelzellen, die zu Kolonien herangewachsen sind, zu untersuchen.

Durch die vorliegende Arbeit kann gezeigt werden, wie stark die hypoxische Fraktion in einem Tumor von Änderungen der Narkose, der Temperatur und des Sauerstoffpartialdrucks der Atemluft abhängt.

Wie wichtig der Zeitpunkt der Tumorexzision ist, zeigen die Versuche zur Erholung vom potentiell lethalen Strahlenschaden (PLD-Erholung). Durch Versuche konnte gezeigt werden, daß Reparaturmechanismen wie PLD-Erholung einen entscheidenden Einfluß auf die Überlebensraten nehmen können.

Zusammenfassend sollte ein Ausblick gegeben werden auf die mögliche Anwendung des Wissens über hypoxische Zellen im menschlichen Tumor in der Strahlentherapie.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Tierstamm

Als Versuchstiere wurden 7-8 Wochen alte, 20-25 g schwere, ingezüchtete weibliche C3H-Mäuse verwendet. Die Tiere wurden von der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung zur Verfügung gestellt.

Nach der Transplantation wurden die Tiere im Stall der GSF untergebracht und zu je 5 Tieren in Macrolon-Käfigen gehalten. Als Nahrung erhielten sie Standardfutter Altromin und Wasser ad libitum.

### 2.2 Tumor

Als Versuchstumor wurde das transplantable Sarkom SSK 2 verwendet, das nach mehreren in vitro-Passagen aus dem methylcholanthreninduzierten Sarkom SSK 31 der C3H-Maus kloniert worden war.

Die histologische Struktur des Tumors ist sehr konstant. Sie entspricht einem zellreichen Fibrosarkom aus spin-deligen Zellen, zum Teil faszikulär verwoben, mit spärlicher Ausbildung kollagener Fasern.

Bis zu einem Tumorgewicht von 100 mg werden keine oder nur sehr kleine Nekrosen beobachtet.

Er besitzt eine Verdopplungszeit von 2 Tagen (bei der Behandlungsgroße von 100 mg), eine mittlere Zellzykluszeit von 14,6 Stunden und hat eine Wachstumsfraktion von 0,48.

Er wurde wegen der Fähigkeit der Tumorzellen, sowohl in vivo als Transplantat als auch in vitro als Zellkultur zu wachsen, für die vorliegenden Versuche verwendet.

Retransplantationen aus tiefgefrorenem Material wurden bis maximal 50 Passagen durchgeführt (Kummermehr, Trott, 1977).

### 2.3. Transplantation des Tumors

Der Tumor einer unbehandelten Spendermaus wurde bei einem Durchmesser von ca. 10 mm nach Abtöten des Tieres herauspräpariert. Anschließend wurde er mit einer Rasierklinge in Stückchen von 1 mm Kantenlänge zerteilt, wobei nekrotisches Gewebe verworfen wurde. Die Tumorstückchen wurden in physiologischer Kochsalzlösung bis zur Transplantation aufbewahrt. Vor der Transplantation wurde den Empfängertieren rechts der Rücken und die Flanke rasiert. Danach wurden die Tiere mit Evipan narkotisiert, die Transplantationsstelle mit Ethanol desinfiziert und mit einer Schere seitlich ein Hautschnitt gesetzt. Durch diesen wurde ein Trokar, der jeweils ein Tumorstückchen enthielt, eingeführt und bis 1 cm unterhalb der rechten Scapula vorgeschoben. Dort wurde der Tumor durch Druck auf den Dorn des Trokars subcutan deponiert. Der Hautschnitt heilte bei allen Tieren komplikationslos ab. Nach 12-13 Tagen konnte der neue Tumor für Versuche verwendet werden.

#### 2.4. Feederzellen

Zellen aus dem Tumor, in Zellkultur gebracht, wachsen nur in Anwesenheit von Feederzellen in so geringer Zelldichte, daß einzelne Klone identifiziert werden können. Feederzellen wurden durch Zellisolierung aus dem Tumor gewonnen. Um sie in Zellkultur lebensfähig zu halten, sät man sie zusammen mit 10 ml Nährmedium und 10 % Kälberserum in Glaskulturflaschen ein und bewahrt sie bei 37°C und CO<sub>2</sub>-Begasung auf. Nach ungefähr einer Woche haben sie einen dichten Zellrasen gebildet (Einsaat ca. 50 - 100 Tausend Zellen) und müssen passagiert werden oder nach Abtrypsinieren in flüssigen Stickstoff aufbewahrt werden. Für die Versuche wurden hauptsächlich aufgetaute Zellen verwendet, die vor ca. 3 Jahren als 10. Passage eingefroren worden sind. Eine Ausnahme bildeten Versuche, wo die Feederzellen direkt aus dem Tumor gewonnen und nach der 4. Passage verwendet worden sind.

Diese Zellen wurden vor dem Versuch mit 60 Gy bestrahlt. Dadurch können sie sich nicht mehr teilen, zeigen aber noch mehrere Tage hindurch Stoffwechselaktivität (von diesen Stoffwechselprodukten hängt es offensichtlich ab, ob vereinzelte Zellen aus dem Tumor in Kultur Klone bilden).

## 2.5. Passage

Die Zellen bilden nach der Einsaat in Glaskulturflaschen nach ca. 1 Woche am Boden einen dichten Zellrasen. Um die Kultur zu erhalten, muß nun passagiert werden. Man saugt das alte Medium ab und gibt 5 ml Sol A auf den Zellrasen, läßt es 5 Minuten einwirken bei 37°C, gießt es ab und ersetzt es durch 2 ml Trypsin (Lösungen siehe unten). Nach weiteren 5 Minuten wird mit einem Gummi-schaber der Zellrasen abgekratzt und mit Hilfe einer 1 ml Pipette suspendiert. Nun wird die Wirkung des Trypsins (Zelldispersion) mit 8 - 18 ml Medium gestoppt und die Zellzahl mit einem Hämazytometer bestimmt. Danach werden gewünschte Zellkonzentrationen in neue Kulturflaschen eingesät.

Um zu sehen, wie gut die Zellen in der Kulturflasche anwachsen, wird einmal im Monat eine Kontrolle gemacht: 250 Zellen werden in eine Kulturflasche eingesät, danach 10 Tage im Brutschrank aufbewahrt und die nun entstandenen Kolonien angefärbt und gezählt. Die Prozentzahl Angehrate, d. h. die sogenannte plating efficiency (PE) berechnet man wie folgt:

$$PE = \frac{\text{Zahl der Kolonien} \times 100}{\text{Einsaat} \times 250} = \%$$

## 2.6. Färbemethode

Ca. 10 - 12 Tage nach Einsaat der Einzelzellen haben diese Kolonien gebildet, die aus mehr als 50 Zellen bestehen. Die Flaschen werden aus dem Brutschrank genommen und auf Zimmertemperatur abgekühlt. Danach wird das Medium abgossen und 10 ml wässrige Methylenlösung auf die Kolonien gegeben. Man wartet ca. 4 Stunden, gießt die Färbelösung ab und kann jetzt unter dem Mikroskop bei geringer Vergrößerung die blau angefärbten Kolonien auszählen.

## 2.7. In vivo-in vitro Methode

Mindestens 2 Tumoren werden aus der Flanke steril entnommen, gewogen und in 5 ml Sol A gegeben. Sofort danach zerkleinert man sie steril in einer Petrischale mit Hilfe einer Schere. Der Brei wird mit 16 - 20 ml Trypsin und 0,5 ml DNase-Lösung versetzt. Das Ganze wird 10 Minuten bei Zimmertemperatur gerührt und kommt danach sofort in ein Eisbad, um die Trypsinwirkung zu unterbrechen. Man filtriert das Gemisch durch eine 4-lagige Gazeschicht (einfache Verbandgaze) und verteilt die Lösung auf vier Zentrifugengläser. Zentrifugiert wird 10 Minuten bei 1200 rpm. Der Überstand wird abgegossen und das Pellet in 2 - 4 ml Vollmedium suspendiert. Danach wird nochmals verdünnt, d. h. auf 15 ml aufgefüllt, 0,5 ml davon entnommen und mit 0,5 ml Eosin versetzt und ausgezählt.

Eosin dient zur Unterscheidung der lebensfähigen Zellen von toten Zellen: es dringt durch die Zellwand in tote Zellen ein und färbt diese rosa, während die lebenden Zellen aufgrund ihrer intakten Zellwand den Farbstoff nicht aufnehmen.

Danach gibt man die gewünschte Verdünnung (bei Kontrolle: 500 lebende Zellen) in eine Kulturflasche und fügt Feederzellen und 10 ml Nährmedium/10 % Serum hinzu. Pro Ansatz werden 8 - 16 Flaschen angesetzt.

Die Flaschen werden bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt.

Nach 4 - 5 Tagen muß das Nährmedium durch frisches ersetzt werden. Teilweise kann ein 2. Mediumwechsel am 6. oder 7. Tag nötig sein.

Nach 10 - 12 Tagen können die neuen Klone angefärbt werden.

## 2.8. Bestrahlungen

Für die Versuche wurden die Tiere an einer  $^{137}\text{Cs}$ -Quelle Ganzkörper bestrahlt. Bei ambienter Bestrahlung wurden die Tiere entweder vorher narkotisiert oder sie konnten sich in einem Gefäß frei bewegen. Bei hypoxischer Bestrahlung wurden die Tiere narkotisiert und der Tumor mit einer Plastikklammer abgeklemmt. Nach 5 Minuten sind alle Zellen aufgrund des durch Zellatmung verbrauchten Sauerstoffs hypoxisch, dann erst wurde bestrahlt. Feederzellen wurden vor jedem Versuch mit 60 Gy an einer  $^{60}\text{Co}$ -Quelle bestrahlt. Dazu wurden Flaschen mit dichtem Zellrasen verwendet, die Zellen wurden nach Bestrahlung abtrypsiniert und verwendet.

## 2.9. Narkose

Während der Behandlung wurden die Tiere mit Evipan (Hexobarbital) narkotisiert: 0,12 ml einer 20 % Evipanlösung wurde ihnen i. p. injiziert. Eine Ausnahme bildeten die Versuche mit verschiedenen Gasgemischen: hier wurde eine Enflurangasnarkose durchgeführt. Zusammen mit den diversen Gasgemischen wurde den Tieren bis zum Einschlafen 5 % Enfluran verabreicht, danach die Konzentration auf 0,75 % gesenkt.

## 2.10. Versuche mit verschiedenen Gasgemischen

Bei diesen Versuchen wurden die Tiere folgenden verschiedenen Gasen und Gasgemischen zum Atmen ausgesetzt: reiner Sauerstoff, Luft, 5 % Sauerstoff und 95 % Stickstoff, 10 % Sauerstoff und 90 % Stickstoff, 15 % Sauerstoff und 85 % Stickstoff. (Die Gase wurden von der Firma Linde bezogen). Die Tiere saßen während der Bestrahlung in einem luftdichten Behälter, durch den das Gas geleitet wurde. Die Gase dienten gleichzeitig als Trägergase für das Narkotikum Enfluran. (Der Behälter war eine Sonderanfertigung der GSF).

## 2.11. Temperaturversuche

Um bei den Tieren unterschiedliche Temperaturen einzustellen (25, 31, 37°C), wurden sie, nachdem man sie mit Evipan narkotisiert hatte, in ein Wasserbad mit der gewünschten Temperatur bis zum Hals eingetaucht. Das Wasserbad bestand aus einem isolierten Behälter, in das Wasser der gewünschten Temperatur gefüllt wurde. Die Wassertemperatur wurde vor und nach jedem Versuch gemessen, die Abweichung betrug 1°C. Die Temperatur der Tiere wurde vor jedem Versuch eingestellt: Die Temperatur sinkt bei einem narkotisierten Tier nur langsam. Um diesen Vorgang zu beschleunigen, wurden die Tiere auf eine kalte Platte gelegt. Die 37°C-Tiere wurden, um Abkühlung zu vermeiden, sodort nach Verabreichung des Narkotikums in 37°C warmes Wasser gelegt. Vor und nach jedem Versuch wurde jeweils die Temperatur rektal gemessen; ihre Schwankungsbreite betrug 1°C.

## 2.12. Reoxygenierung

Alle Tiere wurden zuerst unter ambienten Bedingungen bestrahlt, um alle oxischen Zellen abzutöten. Nach 4, bzw. 24 Stunden wurde eine zweite Dosis verabreicht. Ein Teil der Tiere wurde unter ambienten Bedingungen bestrahlt, um die innerhalb der Zeitspanne reoxygenierten Zellen abzutöten. Die übrigen Tiere wurden hypoxisch bestrahlt (ebenfalls nach 4, bzw. 24 Stunden), die reoxygenierten Zellen sind dadurch wieder hypoxisch wie bei der Erstdosis. Setzt man den hypoxischen Wert gleich 100 %, erhält man aus einem Vergleich mit dem ambienten Wert die hypoxische Fraktion im Tumor, die nach der Reoxygenierung übrig geblieben ist.

Beispiel:

10 Gy ambient, nach 4 h 10 Gy ambient:

0,15 % Überlebensrate

10 Gy ambient, nach 4 h 10 Gy hypoxisch:

0,4 % Überlebensrate

$$\frac{0,15 \times 100}{0,4} = 37,5 \% = \text{hypoxische Fraktion}$$

### 2.13. Chemikalien

Nährmedium:

MEM-Pulvermedium mit Hanks-Salzen (mit L-Glutamin, ohne  
Natriumbicarbonat), Serva-Chemie  
Bycomycin, Byk Gulden, Konstanz  
 $\text{NaHCO}_3$ , Merck

Sol A:

$\text{NaCl}$ , Merck  
 $\text{KCl}$ , Merck  
 $\text{NaHCO}_3$ , Merck  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Merck  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Merck  
Phenolrot, Merck

Trypsin, Difco

EDTA, Serva-Chemie

Phenolrot (in Sol A, Trypsin und Medium enthalten),  
Phenolsulfonphtalein, als Indikator verwendet,  
Farbumschlag bei pH 6,8 - 8,4 (gelb-rot), Merck  
Serum:

Newborn calf serum, Boehringer

Rinderserum Seromed, Biochrom Berlin

Eosin, 0,2 % Lösung, in  $\text{H}_2\text{O}$  dest, Merck

Methylenblau, Merck

DNase I, gelöst in Sol A, 1%, Sigma

Narkotika:

Evipan: Hexobarbital-Natrium, Handelsname Evipan, 140

mg/kg Maus, Bayer Leverkusen

Enfluran,

2-Chlor-1,1,2-trifluor-ethyl(difluor-methyl)-ether, Abbott  
Chemie

#### 2.14. In vivo-in vitro-Methode, Optimierungsversuche

Die in vivo-in vitro-Methode ist nur möglich bei Tumoren, deren Zellen die Eigenschaft haben, sowohl als transplantabler Tumor im Tier zu wachsen als auch als Klone in der Kulturflasche. Die Zellen können von in vivo nach in vitro transferiert werden und umgekehrt. Vorteil dieser Methode ist, daß der Tumor in seiner natürlichen Umgebung behandelt wird, so daß gewebliche Faktoren, die wichtig für die Tumorentwort sind, wirken können. Bei der anschließenden Untersuchung in vitro kann die Reaktion einzelner Zellen beobachtet werden; es sind schnelle, relativ preiswerte Versuche.

Bei der Präparation der Zellsuspension taucht das Problem auf, daß nicht alle Tumorzellen quantitativ erfaßt werden. Man kann nur eine Auswahl der Originalpopulation beobachten. Um dieses Problem möglichst klein zu halten, ist es nötig, 1. eine hohe Zellausbeute zu bekommen, und 2. bei den lebensfähigen Zellen auch eine hohe plating efficiency zu erhalten (Barendsen, 1980).

#### 2.14.1. Zellausbeute

Hier wurde die Ausbeute der Zellisolierung mit der geschätzten Anzahl an Zellen in einem Tumor verglichen. Aufgrund einer histologisch-stereologischen Methode (Köpf, 1983) kann man berechnen, daß 1 g Tumor  $10^9$  Zellen enthält.

Für den Vergleich wurde der Tumor vor der Zellisolierung gewogen, die enthaltene Anzahl der Zellen berechnet und mit der Anzahl der lebenden Zellen verglichen, die nach Suspendierung durch Auszählen erhalten wurde. Bei der Zellisolierung ist der entscheidende Schritt die Trypsinierung des Tumorbreis (Reinhold, 1965). Durch Zugabe von DNase (0,1%) wurde versucht, die Zellausbeute zu verbessern (Tabelle 1).

Tabelle 1: Vergleich der Zellausbeute, mit und ohne DNase

| Gewicht (g) | Zahl der leben-<br>den Tumorzellen | Ausbeute der lebenden<br>Zellen (%) |
|-------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| ohne DNase: |                                    |                                     |
| 0,729       | 1 461 600                          | 0,2                                 |
| 0,151       | 222 720                            | 0,15                                |
| 0,198       | 69 948                             | 0,035                               |
| 0,168       | 1 628 640                          | 0,09                                |
| 0,098       | 2 700 480                          | 0,27                                |
| mit DNase   |                                    |                                     |
| 0,307       | 13 530 240                         | 0,44                                |
| 0,180       | 9 131 520                          | 0,5                                 |
| 0,283       | 16 321 200                         | 0,57                                |
| 0,197       | 9 187 200                          | 0,46                                |
| 0,187       | 6 612 000                          | 0,35                                |

Der Versuch zeigt eine eindeutige Erhöhung der Zellausbeute durch Beigabe von DNase. DNase wurde deshalb bei allen Versuchen verwendet.

Ein weiterer, wichtiger Punkt, der sich durch den Versuch zeigt: Offensichtlich ist das Gewicht des Tumors bei der Zellisolierung nicht ausschlaggebend, wie ein Vergleich eines Tumors mit 700 mg = 0,2 % mit einem Tumor von nur 98 mg = 0,27% zeigt.

#### 2.14.2. Plating efficiency - Feederzellen

Nicht jede Zelle, die aus dem Tumor isoliert wird, bildet einen Klon (Barendsen, 1980). Eine möglichst hohe plating efficiency ist aber anzustreben. Eine der wichtigsten Rollen bei der Klonzüchtung scheinen die Feederzellen zu spielen, mit hoher Dosis bestrahlte Zellen, die nicht mehr klonogen sind, aber noch über mehrere Tage hinweg Stoffwechselaktivität zeigen und deshalb für die Klonzüchtung entscheidend sind. Es wurde deshalb versucht, durch Variationen der Feederzelleinsaat eine möglichst hohe PE zu erhalten.

#### 2.14.2.1. Alte - neue Passage

Alle in vitro-Zellkulturen wurden ursprünglich aus dem Tumor isoliert. In flüssigem Stickstoff können sie über mehrere Jahre aufbewahrt werden. Es wurden nun verschieden "alte" Passagen miteinander verglichen: Jeweils zwei Tumoren wurden für den Versuch suspendiert, 500 und 1000 Zellen pro Flasche eingesät und jeweils 150 Tausend, bzw. 250 Tausend Feederzellen dazugegeben. Diese Feederzellen stammen im ersten Teil des Versuchs aus jeweils unterschiedlichen Passagen (3., 6. und 17. Passage) - sie sind nicht auseinander hervorgegangen. Im 2. Teil des Versuchs wurden teilweise Passagen verwendet, die sich alle auf eine Charge zurückführen lassen (SSK 2/14 - SSK 2/71). Im 3. Teil des Versuchs wurden Feederzellen verwendet, die direkt aus einem Tiertumor isoliert wurden, niemals eingefroren waren und die deshalb den verwendeten Versuchstumoren am ähnlichsten waren (SSK 2/03). (Tabelle 2)

Tabelle 2: Vergleich der PE von alten und neuen Passagen

| Passage  | Einsaat | Feeder | Kolonien          | PE     |
|----------|---------|--------|-------------------|--------|
| SSK 2/3  | 500     | 150 Ts | 110,116           | 22,6 % |
| SSK 2/3  | 1 000   | 150 Ts | 163,160,166       | 16,3 % |
| SSK 2/6  | 500     | 150 Ts | 78,58,80,69,78,56 | 13,9   |
| SSK 2/6  | 1 000   | 150 Ts | 112,148,89,96,119 | 11,3   |
| SSK 2/17 | 500     | 150 Ts | 26,12,25,15       | 2,4    |
| SSK 2/17 | 1 000   | 150 Ts | 31,46,30,32,32    | 3,4    |
| SSK 2/10 | 500     | 150 Ts | 31,19,49,32       | 6,5    |
| SSK 2/10 | 1 000   | 150 Ts | 42,88,47          | 5,9    |
| SSK 2/18 | 500     | 150 Ts | 38,39,50,50       | 8,9    |
| SSK 2/14 | 1 000   | 150 Ts | 102,77,107,91,105 | 9,6    |
| SSK 2/15 | 500     | 150 Ts | 28,36,35,38,26    | 6,5    |
| SSK 2/15 | 1 000   | 150 Ts | 41,44,58,61,38    | 4,8    |
| SSK 2/17 | 500     | 150 Ts | 26,12,25,15       | 3,9    |
| SSK 2/17 | 1 000   | 150 Ts | 31,46,30,32,32    | 3,4    |
| SSK 2/53 | 500     | 250 Ts | 8,18,8,17,11,6    | 2,3    |
| SSK 2/71 | 500     | 250 Ts | 4,6,7             | 1,13   |
| SSK 2/03 | 500     | 250 Ts | 58,54,53,32,40    | 9,5    |

PE = plating efficiency

Bezeichnungen der Passagen: siehe vorhergehenden Text

Die Versuche zeigten, daß ab einer bestimmten Passagenzahl (40-50) die Zellen verworfen und neu aufgetaute verwendet werden sollten. Aber auch schon bei niedrigen Passagenzahlen ergaben sich große Schwankungen zwischen den Zelllinien, z. B. SSK 2/3, SSK 2/6 und SSK 2/17. Außerdem zeigte sich bei niedrigen Passagenzahlen ein plötzliches Abfallen der PE: SSK 2/14, SSK 2/15 und SSK 2/17. Zu berücksichtigen ist auch, daß ein Schwanken innerhalb der PE nicht nur auf die Feederzellen zurückzuführen ist. Am besten geeignet für die Versuche waren die Feederzellen, die aus dem Tumor direkt in Kultur gebracht worden waren (für Versuche verwendet ab der 3. Passage). Diese Zellen zeigen nicht nur eine gute PE, sondern wachsen auch langsamer, was der Koloniebildung der Tumorzellen zugute kommt: es genügt ein einmaliger Mediumwechsel, die Kolonien erscheinen eindeutig und groß, während sie in Anwesenheit von "alten" Feederzellen oft nur sehr klein dahinvegetieren. Es könnte sein, daß der Tumor sich im Lauf der Zeit verändert und deshalb bei späteren Passagen ganz andere Zelleigenschaften auftreten. Deshalb könnte es günstig sein, Feederzellen zu verwenden, die ungefähr dem Passagenalter des Tumors entsprechen.

#### 2.14.2.2. Mediumwechsel

Ob die Feederzellen gut oder schlecht wachsen, und, davon abhängig, die Fähigkeit der Tumorzellen, Klone zu bilden, wird auch davon bestimmt, wann und wie oft das Medium während der Wachstumsphase ausgetauscht wird.

Für den Versuch wurden immer gleiche Einsaaten gewählt: 500 Zellen aus der Tumorsuspension und je 250 Tausend Feederzellen. Durch verschieden häufigen Austausch des Mediums (1x, 2, und 3x) an unterschiedlichen Tagen (7.; 4. und 6.; 4. und 7.; 5. und 7.; 5. und 8.; 6. und 8.; 4., 6. und 10; 4., 7, und 10.; 5., 7. und 10; 5., 8. und 10.) wurde versucht, die optimale Kombination herauszufinden. (Tabelle 3)

Tabelle 3: Unterschiedliche PE bei Austausch des Nährmediums an verschiedenen Tagen:

| Einsaat | Feeder | Kolonien                    | Mediumwechsel<br>am x. Tag | PE   |
|---------|--------|-----------------------------|----------------------------|------|
| 500     | 250 Ts | 66,54,67,77,73              | 4. u. 7.                   | 13,5 |
| 500     | 250 Ts | 99,64,81,92,75              | 6. u. 8.                   | 16,4 |
| 500     | 250 Ts | 99,64,81,92,75              | 7.                         | 2,5  |
| 500     | 250 Ts | 123,140,                    | 4. u. 6.                   | 26,3 |
| 500     | 250 Ts | 72,104,59,86,102            | 4. u. 7.                   | 17   |
| 500     | 250 Ts | 106,125,60                  | 5. u. 7.                   | 19,4 |
| 500     | 250 Ts | 76,74,76                    | 5. u. 8.                   | 15   |
| 500     | 250 Ts | 86,78,105,124,<br>109,93,75 | 6. u. 8.                   | 19   |
| 500     | 250 Ts | 199,169,181,166             | 4., 6. u. 10.              | 35,7 |
| 500     | 250 Ts | 140,148,136                 | 4., 7. u. 10.              | 28   |
| 500     | 250 Ts | 134,151                     | 5., 7. u. 10.              | 28,5 |
| 500     | 250 Ts | 127,128                     | 5., 8. u. 10.              | 25,5 |
| 500     | 250 Ts | 103,94,130                  | 6., 8. u. 10.              | 21,8 |

Das schlechteste Ergebnis zeigte sich bei nur einmaligem Mediumwechsel am 7. Tag. Besser waren die Ergebnisse bei zweimaligem Mediumwechsel, wobei offensichtlich die Kombination 4. und 6. Tag am günstigsten ist. Die höchsten PE-Werte zeigten sich bei dreimaligem Mediumwechsel.

Eine Methode, allzu große Unterschiede wie in der gezeigten Tabelle zwischen zwei- und dreimaligem Mediumwechsel zu vermeiden, war es, Feederzellen zu verwenden, die aus einem Tumor in Zellkultur gebracht und danach sofort verwendet wurden. Diese Zellen wachsen langsamer als die Zellen, die schon lange in Zellkultur existieren und es genügt ein zweimaliger Mediumwechsel.

#### 2.14.2.3. Anzahl der Feederzellen

Die Höhe der PE hängt auch davon ab, wieviel Feederzellen pro Kulturflasche eingesät werden im Verhältnis zu den zu untersuchenden Tumorzellen.

Für einen Versuch wurden Tumoren mit 16 Gy bestrahlt und jeweils 20 bis 100 Tausend Zellen zusammen mit 100 bis 200 Tausend Feederzellen in eine Kulturflasche gegeben. Das Medium wurde einheitlich am 5. und 7. Tag ausgetauscht. (Tabelle 4)

Tabelle 4: Unterschiedliche PE bei verschiedenen Einsaaten von Feederzellen:

| Dosis          | Einsaat | Feeder | Kolonien = <del>Ø</del> | MW     | sf(%) |
|----------------|---------|--------|-------------------------|--------|-------|
| K <sub>0</sub> | 500     | 150 Ts | 19,32=25,5              | 5.u.7. | 5,1   |
| "              | 500     | 150 Ts | 31,49=40                | "      | 8     |
| "              | 1 Ts    | 150 Ts | 42,88,47=59             | "      | 5,9   |
| 16 Gy          | 20 Ts   | 150 Ts | 18,29=23,5              | "      | 1,86  |
| 16 Gy          | 20 Ts   | 200 Ts | 44,28=36                | "      | 2,84  |
| 16 Gy          | 50 Ts   | 100 Ts | 72                      | "      | 2,28  |
| 16 Gy          | 50 Ts   | 150 Ts | 94,76,60=76,7           | "      | 2,42  |
| 16 Gy          | 50 Ts   | 100 Ts | 50,75=62,5              | "      | 1,97  |
| 16 Gy          | 50 Ts   | 150 Ts | 80,70,94=81,3           | "      | 2,57  |
| 16 Gy          | 100 Ts  | 100 Ts | 73,106=89,5             | "      | 1,41  |
| 16 Gy          | 100 Ts  | 150 Ts | 114,113,92=106,3        | "      | 1,68  |

MW 5.u.7. = Mediumwechsel am 5. und 7. Tag

Die Überlebensraten (sf) der bestrahlten Ansätze wurden entsprechend der Kontrolle korrigiert:

$$\frac{5,1 + 8 + 5,9}{3} = 6,3 \% = \text{Kontrolle} = 100 \% \text{sf}$$

Wenn bei 20 000 Zellen Ansatz 23,5 Kolonien gefunden werden dann sf =

$$\frac{23,5 \times 100}{20\,000} \times \frac{100}{6,3} = 1,86\%$$

Eindeutig zeigt sich, daß die jeweils höhere Einsaat an Feederzellen bessere Ergebnisse bringt. Die Menge der Feederzellen sollte aber nicht dazu führen, die Tumorzellen bezüglich Platz und Nahrung einzuschränken. Am günstigsten scheint es zu sein, wenn die Gesamtzellzahl pro Flasche in einem vergleichbaren Rahmen gehalten wird.

Z. B.:

Ko: 500 Zellen und 200 000 Feederzellen = 200 500 Zellen

16 Gy: 20 Ts Zellen und 200 Ts Feederzellen = 220 000  
Zellen

16 Gy: 50 Ts Zellen und 150 Ts Feederzellen = 200 Ts  
Zellen

### 3. Hauptversuche

#### 3.1. Dosiseffektkurven in vitro

Um die Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen zu untersuchen wurden Dosiseffektkurven erstellt. Bei der in vivo-in vitro Methode werden die Zellen im Tier behandelt und danach in Zellkultur gebracht. Deshalb wurde zunächst eine Dosiseffektkurve in vitro untersucht, um die Reaktion der Zellen in vivo mit denen in vitro vergleichen zu können.

Zellen in Zellkultur, die einen gleichmäßigen Zellrasen gebildet hatten (ungefähr eine Woche nach Einsaat), wurden abtrypsiniert und in neue Flaschen eingesät (ohne Feederzellen). Nach 6 Stunden im Brutschrank wurden sie mit verschiedenen Dosen bestrahlt (2, 6, 9 u. 12 Gy). Pro Dosis wurden 4 - 6 Versuche gemacht und zu jedem Versuch eine unbestrahlte Kontrolle. (Tabelle 5)

Tabelle 5: Dosiseffektkurve in vitro

| Dosis               | Überlebensraten der Versuche (%) |      |      |       |       | Durchschnitt |
|---------------------|----------------------------------|------|------|-------|-------|--------------|
| K <sub>0</sub> 90,8 | 83,75                            | 97,6 | 85   | 80,35 | 87,7  | 87,2         |
| 2 Gy                |                                  |      |      |       | 58,78 |              |
| 3 Gy 68,8           | 62,4                             | 56,7 | 56,6 | 63,7  |       | 61,47        |
| 4 Gy                |                                  |      |      |       | 34,1  | 34,1         |
| 6 Gy 13,3           | 15,4                             | 15,2 | 18,9 | 14,8  | 14,8  | 15,31        |
| 8 Gy                |                                  |      |      |       | 2,134 | 2,134        |
| 9 Gy 2,1            | 1,6                              | 2,0  | 4,6  |       |       | 2,05         |
| 12Gy 0,09           | 0,17                             | 0,07 | 0,8  |       |       | 0,14         |

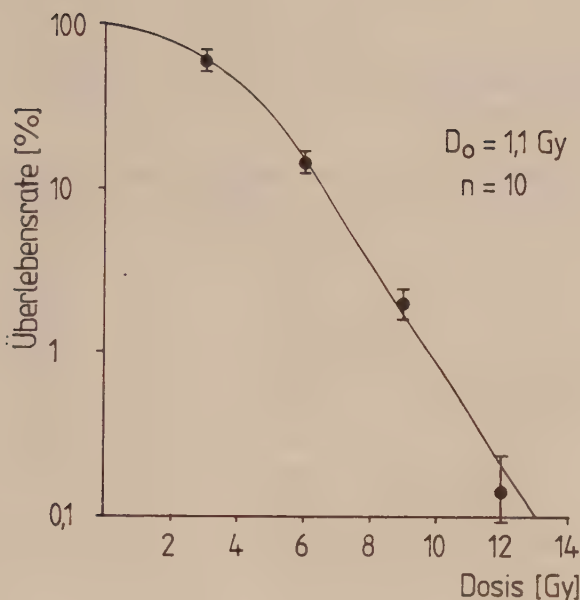


Abbildung 1:

Die Abbildung zeigt eine Dosiseffektkurve, erstellt unter in vitro Bedingungen. Es handelt sich um eine typische Schulterterkurve. Sie ist definiert durch eine  $D_0$  von 1,1 Gy und einer Extrapolationszahl von  $n = 10$ .

### 3.2.Dosiseffektkurve in vivo, hypoxisch

Um die Strahlenempfindlichkeit der Tumoren zu untersuchen, wurde eine Dosiseffektkurve unter hypoxischen Bedingungen erstellt

Je zwei bis drei Tiere wurden für diesen Versuch mit Evipan narkotisiert, danach der Tumor abgeklemmt. Nach fünf Minuten wurden die Tiere mit Dosen zwischen 6 und 30 Gy bestrahlt, und sofort danach wurde der Tumor herausgenommen und die Zellen in vitro plattiert. Es wurden 7 Versuche gemacht, zu jedem Versuch jeweils eine unbestrahlte Kontrolle. (Tabelle 6)

Tabelle 6: Dosiseffektkurve in vivo, unter hypoxischen Bedingungen bestrahlt:

| Dosis | Prozent Überlebensrate (sf) |
|-------|-----------------------------|
| 6 Gy  | 12,2                        |
| 7 Gy  | 12,5                        |
| 10 Gy | 9,65                        |
| 12 Gy | 3,21                        |
| 14 Gy | 2,96                        |
| 18 Gy | 0,73                        |
| 20 Gy | 0,65                        |
| 21 Gy | 0,39                        |
| 24 Gy | 0,05                        |
| 28 Gy | 0,013                       |
| 30 Gy | 0,02                        |

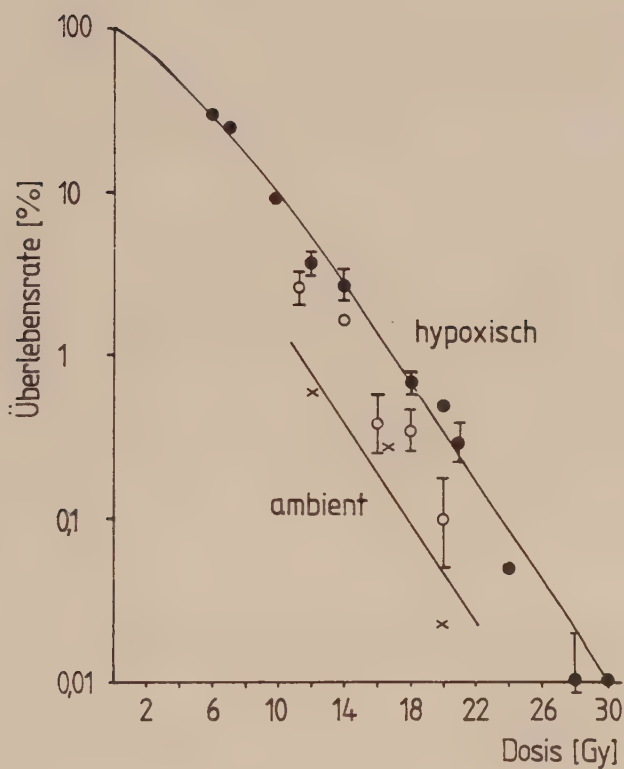


Abbildung 2: Dosiseffektkurve, in vivo

Die Tiere wurden unter hypoxischen Bedingungen bestrahlt (rechte Kurve). Die Dosiseffektkurve ist charakterisiert durch eine  $D_0$  von 2,7 Gy und  $n = 3$ .

● Werte aus den beschriebenen Versuchen vgl. Tabelle 6  
○ und x: siehe unten

### 3.3 Dosiseffektkurve in vivo, ambient

Eine Dosiseffektkurve in vivo wurde ambient erstellt, um aus dem Vergleich mit 3.2., d. h. der sogenannten hypoxischen Dosiseffektkurve, die Größe der hypoxischen Fraktion im Tumor abzulesen.

2 - 3 Tiere wurden vor jedem Versuch narkotisiert (eine Ausnahme bildeten zwei Versuche, bei denen die Tiere nicht narkotisiert wurden, die Tiere bewegten sich frei während der Behandlung). Bestrahlt wurde mit Dosen zwischen 12 und 20 Gy, eine unbestrahlte Kontrolle wurde zu jedem Versuch gemacht.

Bei einem Teil der Versuche wurde zum direkten Vergleich ein hypoxisch bestrahlter Ansatz gemacht, insgesamt waren es 9 Versuche.

(Tabelle 7)

Tabelle 7: Dosiseffektkurve in vivo, ambient bestrahlt.

| Dosis (Gy) | sf (%) | sf (%), ohne Narkose |
|------------|--------|----------------------|
| 12         | 2,65   | 0,6                  |
| 14         | 1,7    |                      |
| 16         | 0,39   | 0,19                 |
| 18         | 0,35   |                      |
| 20         | 0,1    | 0,025                |

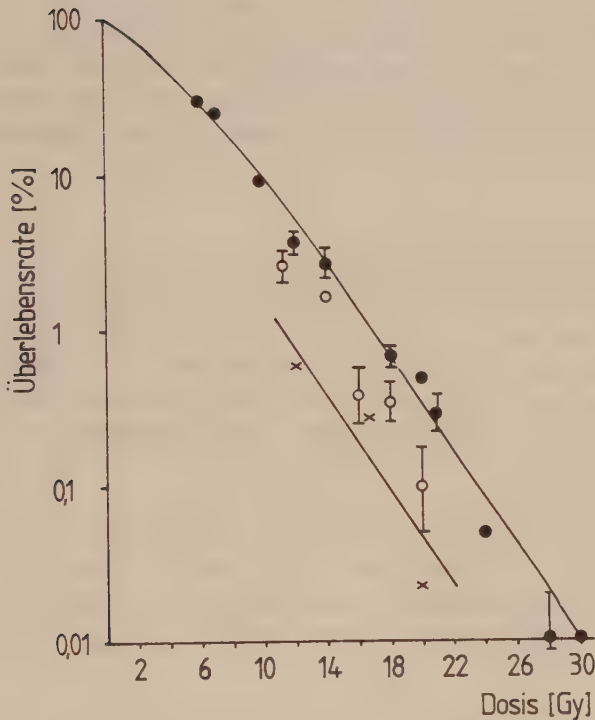


Abbildung 3 : Linke Kurve

Dosiseffektkurve, unter ambienten Bedingungen bestrahlt.  
(x Werte von nicht narkotisierten Tieren, ○ Werte von  
barbitalnarkotisierten Tieren).

Unter ambienten Bedingungen und Barbitalnarkose (○) zeigt  
sich eine  $D_0$  von 2,7 Gy, die hypoxische Fraktion liegt bei  
40 %, bei ambienten Versuchen ohne Barbitalnarkose (x)  
ergibt sich eine  $D_0$  von 2,7 Gy, die hypoxische Fraktion  
beträgt nur noch 12 %.

● Daten aus dem Versuch 3.2.

Die hypoxische Fraktion kann aus einem Vergleich der Dosis-effektkurven ambient/hypoxisch ermittelt werden:

Die ambiente Kurve wird entsprechend der Form der hypoxischen Kurve zur Ordinate hin extrapoliert, der Wert der hypoxischen Fraktion kann dann an der Ordinate abgelesen werden.

### 3.4. Einfluß von Narkose auf die hypoxische Fraktion

Narkotisierte und nichtnarkotisierte Tiere zeigen bezüglich der Dosiseffektkurve in vivo, ambient deutlich Unterschiede. So war gesondert zu untersuchen, ob der chemisch-physiologische Eingriff von Hexobarbital eine Veränderung der Überlebensrate bewirkt.

Je 2 Tiere wurden ambient bestrahlt: einmal mit Hexobarbital narkotisiert, der andere Teil nicht narkotisiert; zu jedem Versuch wurden unbestrahlte Kontrollen untersucht. (Es wurden 2 Versuche durchgeführt). (Tabelle 8)

Tabelle 8: Vergleich der Überlebensraten nichtnarkotisierter Tiere und narkotisierter:

| Dosis (Gy) | sf, narkotisiert (%) | sf, nichtnarkotisiert (%) |
|------------|----------------------|---------------------------|
| 12         | 14,3                 | 0,65                      |
|            | 1,087                | 0,33                      |
| 16         | 1,93                 | 0,18                      |
|            | 1,35                 | 0,15                      |
| 20         | 0,416                | 0,015                     |
|            | 0,766                | 0,007                     |

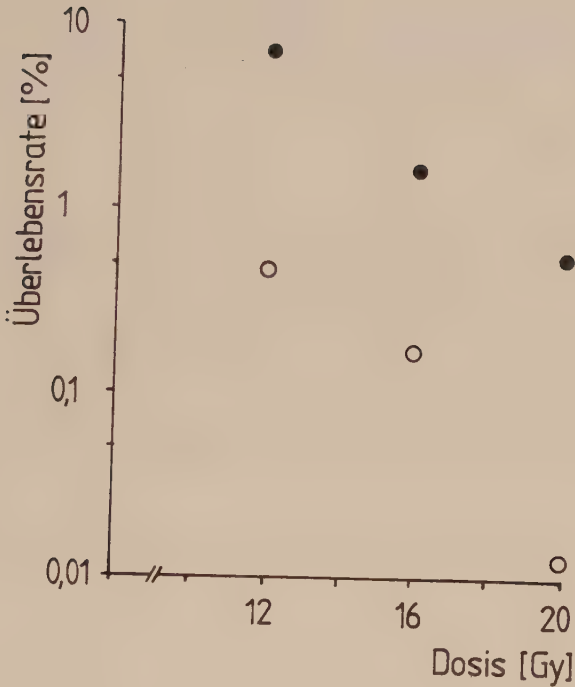


Abb.4: Vergleich der Überlebensraten nichtnarkotisierter Tiere und narkotisierter Tiere.

Die Tiere wurden unter ambienten Bedingungen mit 12, 16 und 20 Gy bestrahlt, ein Teil der Tiere wurde mit Barbitol narkotisiert (●), der andere Teil nicht narkotisiert (○) behandelt. Es zeigt sich eine deutlich höhere Strahlenempfindlichkeit, wenn die Tiere nicht narkotisiert werden.

### 3.5. Temperatur

Das Narkotikum Hexobarbital bewirkt eine starke Temperatursenkung bei den Tieren. Deshalb sollte untersucht werden, ob der Temperaturabfall mit der Erhöhung der Strahlenresistenz zusammenhängt. Alle Tiere wurden narkotisiert und mit Wasserbädern die normale Körpertemperatur und tiefere Temperaturen eingestellt.

Um zu sehen, wie rasch und wie tief die Temperatur bei einem narkotisierten Tier sinkt, wurde eine Maus mit Evipan narkotisiert und der Temperaturabfall sofort rektal gemessen (Tab. 9). Folgende Temperaturen wurden eingestellt: 25, 31 und 37°C ((37°C ist die normale Körpertemperatur der Maus). Zwei Versuche wurden mit 12, 16 und 20 Gy durchgeführt und 2 Versuche mit 16 Gy. (Tabelle 10). Die Temperaturabweichung während des Versuchs betrug 1°C.

Tabelle 9: Temperaturabfall während der Narkose

Nichtnarkotisiertes Tier: 37°C

Narkotisiertes Tier (Hexobarbital 140 mg/kg Maus):

| nach | 5 Minuten | 36 (°C) |
|------|-----------|---------|
| "    | 10        | "       |
|      |           | 34,3    |
| "    | 15        | "       |
|      |           | 33,1    |
| "    | 20        | "       |
|      |           | 32,2    |
| "    | 25        | "       |
|      |           | 31,5    |
| "    | 30        | "       |
|      |           | 29,1    |
| "    | 31        | "       |
|      |           | 30,0    |
| "    | 35        | "       |
|      |           | 31,2    |
| "    | 40        | "       |
|      |           | 31,5    |
| "    | 45        | "       |
|      |           | 32,1    |
| "    | 50        | "       |
|      |           | 32,6    |
| "    | 55        | "       |
|      |           | 32,8    |
| "    | 60        | "       |
|      |           | 33,1    |

Nach 30 Minuten wacht das Tier langsam auf.

Die Messungen wurden bei normaler Raumtemperatur durchgeführt.

Tabelle 10: Vergleich der Überlebensraten bei verschiedenen Temperaturen und Dosen

| Dosis Versuchsnr. 37°C |    |        | 31°C   | 25°C    |
|------------------------|----|--------|--------|---------|
| 12 Gy                  | 1. | 0,368  | 1,38   | 0,0966  |
|                        | 2. | 2,92   | 0,15   | 0,489   |
| Durchschnitt           |    | 1,64   | 0,765  | 0,29    |
| 16 Gy                  | 1. | 0,072  | 0,79   | 0,012   |
|                        | 2. | 1,165  | 0,0125 | 0,03    |
|                        | 3. | 0,625  | 0,285  | 0,41    |
|                        | 4. | 0,364  | 0,348  | 0,178   |
| Durchschnitt           |    | 0,5565 | 0,359  | 0,1575  |
| 20 Gy                  | 1. | 0,044  | 0,0475 | 0,077   |
|                        | 2. | 0,085  | 0,039  | 0,04    |
| Durchschnitt           |    | 0,0645 | 0,043  | 0,05859 |

Alle Werte wurden auf eine Kontrolle von 10 % bezogen.

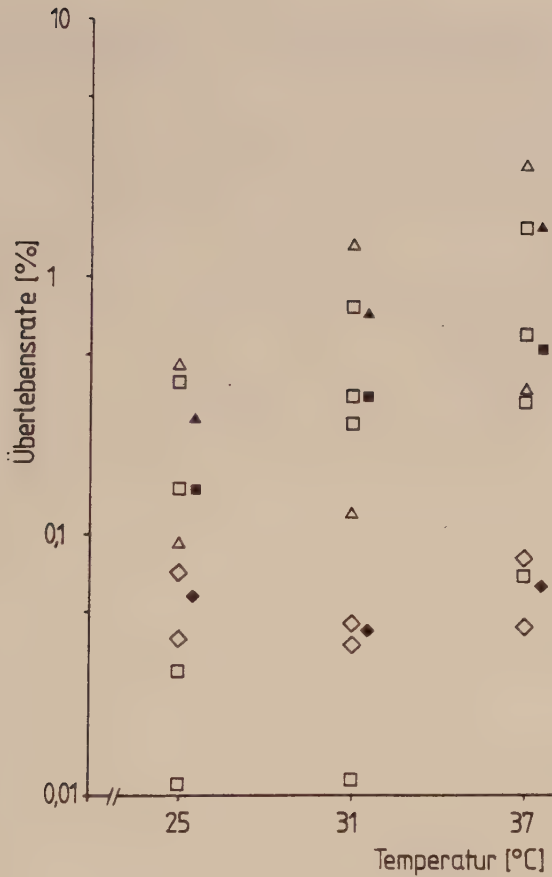


Abb. 5: Vergleich der Überlebensraten bei verschiedenen Temperaturen (25, 31 und 37 °C) und verschiedenen Dosen: 12 Gy ( $\Delta$ ), 16 Gy ( $\square$ ) und 20 Gy ( $\diamond$ ).

Die ausgefüllten Symbole zeigen die Mittelwerte an.  
Die Temperaturen wurden mit Hilfe eines Wasserbades bei den Tieren eingestellt. Die Bestrahlung erfolgte ambient unter Barbitalnarkose.

Sofort nach Verabreichung des Narkotikums fällt die Temperatur des Tieres rasch ab, nach einer halben Stunde liegt sie bei 29°C, danach steigt sie nur sehr langsam wieder auf ihren ursprünglichen Wert. Beim Vergleich verschiedener Temperaturen zeigt sich die höchste Überlebensrate bei 37°C, je niedriger die Temperatur ist, desto mehr sinkt auch die Überlebensrate, der Tumor wird mit abnehmender Temperatur empfindlicher. Mit steigender Dosis verschwindet dieser Effekt. Bei 25 °C und 31 ° C treten relativ große Schwankungen in den Überlebensraten auf.

### 3.6. Einfluß der Sauerstoffkonzentration der Atemluft auf die hypoxische Fraktion

Um die Abhängigkeit der hypoxischen Fraktion von der eingeatmeten Sauerstoffkonzentration zu untersuchen, wurden die Tiere während der Bestrahlung mit verschiedenen Sauerstoffgemischen beatmet.

Als Sauerstoffgemische wurden verwendet: reiner Sauerstoff, Druckluft, 5 % Sauerstoff und 95 % Stickstoff, 10 % Sauerstoff und 90 % Stickstoff und 15 % Sauerstoff und 85 % Stickstoff. Je zwei Tiere wurden jeweils mit 12, 16 und 20 Gy bestrahlt und während der Behandlung mit Enfluran in Narkose gehalten. (Tabelle 11)

Tabelle 11: Einfluß der Sauerstoffkonzentration der Atemluft auf die hypoxische Fraktion.

| Dosis | 100 % O <sub>2</sub> | Luft   | 15 % O <sub>2</sub> | 10 % O <sub>2</sub> | 5 % O <sub>2</sub> |
|-------|----------------------|--------|---------------------|---------------------|--------------------|
| 12 Gy | 0,254                | 8,859  | 4,295               | 6,93                | 10,96              |
|       | 1,045                | 17,04  | 5,64                | 3,889               | 9,82               |
|       | 0,14                 | 3,653  | 3,42                | 3,93                | 8,4                |
|       | 0,59                 | 3,346  |                     |                     |                    |
| Ø     | 0,385                | 6,554  | 4,359               | 4,731               | 9,696              |
| 16 Gy | 0,26                 | 1,438  | 0,079               | 2,609               | 8,048              |
|       | 0,045                | 1,558  | 0,375               | 2,182               | 3,08               |
|       | 0,07                 | 0,286  | 0,24                | 1,23                | 3,296              |
|       | 0,118                | 0,496  |                     |                     |                    |
| Ø     | 0,099                | 0,751  | 0,192               | 1,913               | 4,339              |
| 20 Gy | 0,02                 | 0,0178 | 0,055               | 0,338               | 1,78               |
|       | -                    | 0,1166 | 0,198               | 0,47                | 0,97               |
|       | 0,026                | 0,0816 | 0,0814              | 0,257               | 0,7557             |
|       | -                    | 0,0428 |                     |                     |                    |
| Ø     | 0,023                | 0,052  | 0,096               | 0,344               | 1,093              |

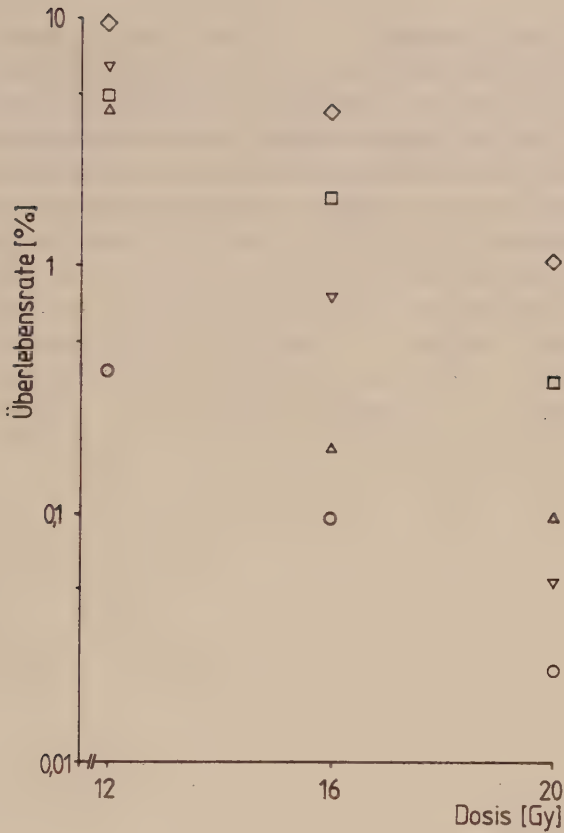


Abb. 6: Einfluß der Sauerstoffkonzentration der Atemluft auf die hypoxische Fraktion

- reiner Sauerstoff
- ▽ Druckluft
- △ 15 % Sauerstoff, 85 % Stickstoff
- ◻ 10 % Sauerstoff, 90 % Stickstoff
- ◇ 5 % Sauerstoff, 95 % Stickstoff

Die Tiere wurden jeweils unter Narkose mit 12, 16 und 20 Gy ambient bestrahlt.

Die Strahlenempfindlichkeit ist eindeutig am kleinsten bei Beatmung mit reinem Sauerstoff. Bei 15 % Sauerstoff-Beatmung nimmt sie ab gegenüber reinem Sauerstoff, und die Resistenz nimmt stetig zu, wird 10 % und 5 % Sauerstoff gegeben. Werden die Tiere mit Luft beatmet, was einem Sauerstoffgehalt von ca. 21 % entspricht, so liegen die Werte zwischen den Werten der Gasgemische.

### 3.7. Reoxygenierung

Um zu untersuchen, wann Reoxygenierung auftritt, wurde eine Zweitdosis einmal 4 Stunden, ein anderes Mal 24 Stunden nach der Erstdosis gegeben. Je 2 Tiere wurden mit 10 Gy, bzw. 6,5 Gy, ambient bestrahlt. Nach 4 oder 24 Stunden wurde die zweite Dosis gegeben. Die zweite Dosis bestand aus 10, bzw. 15 Gy, bzw. 6,5 Gy, wobei ein Teil der Tiere ambient, der andere Teil hypoxisch bestrahlt wurde, um aus der Differenz den Anteil an Zellen zu erhalten, der reoxygeniert war. (Alle Versuche wurden unter Hexobarbitalnarkose durchgeführt)(Tabelle 12).

Tabelle 12: Reoxygenierung

| Dosis                    | Versuche (% sf) |          |          |
|--------------------------|-----------------|----------|----------|
| 10 Gy a n. 24 h -        | 1,65            | 0,548    |          |
| 10 Gy a nach 4 h 10 Gy a | 0,15            | 0,04     | 0,04     |
| 10 Gy a nach 4 h 10 Gy h | 0,4             | 0,3      | 0,09     |
| Hypoxische Fraktion      | = 37,5 %        | = 13,3 % | = 44,4 % |
| 10 Gy a n. 24 h 10 Gy a  | 0,0178          |          |          |
| 10 Gy a n. 24 h 10 Gy h  | 0,091           |          |          |
| Hypoxische Fraktion      | = 19,5 %        |          |          |

a = ambient bestrahlt

h = hypoxisch bestrahlt

n. 24 - = nach 24 h Exzision

Wird im 4 Stunden-Intervall mit 10 + 10 Gy bestrahlt, erhält man 37,5 %, 13,3 % und 44,4 % hypoxische Zellen (im Mittel 31,7 %). Nach einem 24 Stunden Intervall, bei gleicher Dosis, sind es 19,5 %.

3.8. Einfluß der Dauer, die bestrahlte Zellen im Tumor vor  
Explantation verweilen (operationell als PLD-Repair  
definiert). (PLD-Repair = potentially lethal damage-repair)

Der Versuch sollte mögliche Unterschiede der Überlebensraten zwischen sofortiger und späterer Exzision des Tumors zeigen.

Es wurde Zeitund Dosisabhängigkeit untersucht.

**Zeitabhängigkeit:**

Vier Versuche wurden unter hypoxischer Bestrahlung durchgeführt mit 0, 2, 4, 6 (12) und 24 Stunden-Intervall. (= die Zeit zwischen Behandlung des Tumors und Explantation des Tumors). Bestrahlt wurde mit einer Dosis von 22 Gy. (Tabelle 13) Unter ambienten Bedingungen wurden 7 Versuche durchgeführt mit einer Dosis von 16,5 Gy und zeitlichen Intervallen von 0, 2, 4, 6 (12) und 24 Stunden. (Tabelle 14) Zu jedem Versuch wurde eine unbestrahlte Kontrolle durchgeführt.

**Dosisabhängigkeit:**

Um die Dosisabhängigkeit zu untersuchen, wurden 4 Versuche mit zeitlichen Intervallen von 0 und 24 Stunden gemacht, und bestrahlt mit Dosen von 16, 22 und 28 Gy, hypoxisch verabreicht. Zu jedem Versuch wurde eine unbestrahlte Kontrolle gemacht. (Tabelle 15)

Tabelle 13: PLD-Repair, Zeitabhängigkeit, unter hypoxischen Bedingungen.

| Zeitraum | Versuche (% sf) |       |       |      | Durchschnitt |
|----------|-----------------|-------|-------|------|--------------|
| 0 h      | 0,0270          | 0,019 | 0,21  | 0,17 | 0,1065       |
| 2 h      | -               | 0,074 | 0,50  | 0,44 | 0,338        |
| 4 h      | 0,129           | 0,081 | 0,675 | 0,54 | 0,356        |
| 6 h      | (0,01)          | 0,213 | (0,3) | 0,67 | 0,394        |
| 12 h     | -               | 1,22  | -     | -    | (1,22)       |
| 24 h     | 0,425           | -     | 1,50  | -    | 0,963        |

Kontrolle: 10,8 %

Tabelle 14: PLD-Repair, Zeitabhängigkeit unter ambienten Bedingungen

Bestrahlt mit 16,5 Gy, Kontrolle 10,8 % :

| Zeitraum | Versuche (% sf) |       |       |       |       | Durchschnitt |
|----------|-----------------|-------|-------|-------|-------|--------------|
| 0 h      | 0,0425          | 0,273 | -     | 0,075 | 0,115 | 0,13         |
| 2 h      | 0,060           | 0,420 | 0,370 | 0,18  | 0,205 | 0,25         |
| 4 h      | 0,065           | -     | 0,355 | 0,205 | 0,213 | 0,22         |
| 6 h      | 0,060           | 0,499 | 0,360 | 0,310 | 0,145 | 0,28         |
| 12 h     | 0,124           | -     | -     | -     | -     | (0,1)        |
| 24 h     | 0,356           | 0,409 | 0,620 | 0,570 | 0,255 | 0,445        |

Bestrahlt mit 18 Gy, Kontrolle 10,8 % :

|     |        |       |  |  |  |       |
|-----|--------|-------|--|--|--|-------|
| 0 h | 0,0245 | 0,035 |  |  |  | 0,029 |
| 2 h | 0,0601 | 0,210 |  |  |  | 0,135 |
| 4 h | 0,1066 | 0,114 |  |  |  | 0,11  |
| 6 h | 0,110  | 0,202 |  |  |  | 0,156 |

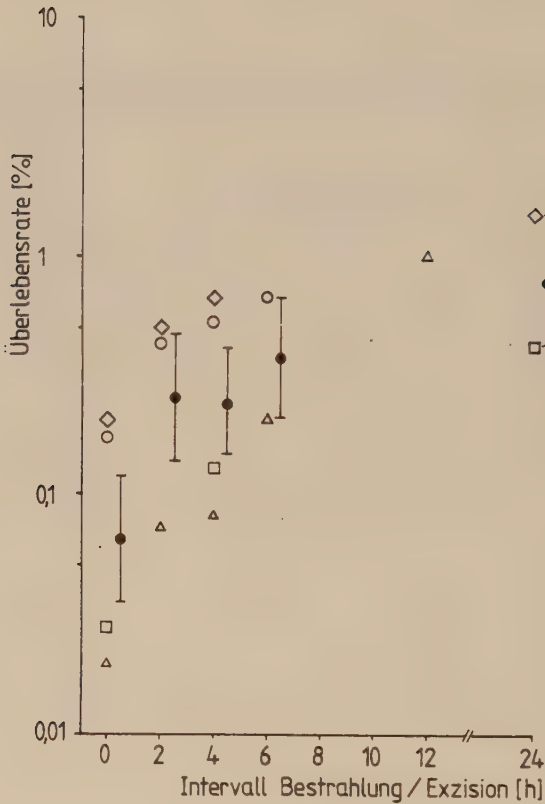


Abb. 7: PLD-Repair, Zeitabhängigkeit unter hypoxischen Bedingungen

Bestrahlt mit 22 Gy

◇

○

einzelne Versuche

□

△

● = Durchschnittswert

Die Tiere wurden unter hypoxischen Bedingungen mit 22 Gy bestrahlt. Die Exzision erfolgte nach Behandlung nach 2, 4, 6, 12 oder 24 Stunden. Die offenen Symbole geben einzelne Versuche an, mit ● wurde der Mittelwert bezeichnet.

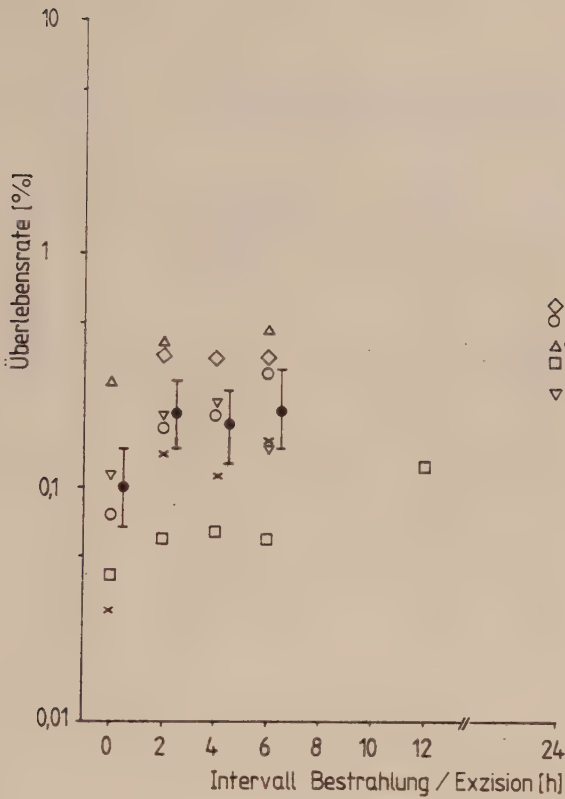


Abb. 8: PLD-Repair, Zeitabhängigkeit unter ambienten Bedingungen

Bestrahlt mit 16,5 Gy

△

▽

□

einzelne Versuche

○

● = Mittelwert

x = Mittelwert 18 Gy

Die Tiere wurden unter Narkose ambient mit 16,5, bzw. 18 Gy bestrahlt. Die Exzision der Tumoren erfolgte nach Behandlung nach 2, 4, 6, 12 oder 24 Stunden.

Tabelle 15: PLD-Repair, Dosisabhängigkeit unter hypoxischen Bedingungen

| Dosis | Zeit 0 h | Zeit 24 h |
|-------|----------|-----------|
| 16 Gy | 1. 2,258 | 3,789     |
|       | 2. 4,269 | 9,956     |
|       | 3. 1,853 | 2,08      |
|       | 4. 1,175 | 1,685     |
| 22 Gy | 0,2725   | 1,505     |
|       | 0,494    | 3,286     |
|       | 0,195    | 0,675     |
|       | 0,175    | 0,265     |
| 28 Gy | 0,020    | 0,830     |
|       | 0,035    | 0,170     |
|       | -        | 0,025     |
|       | 0,0125   | 0,0695    |

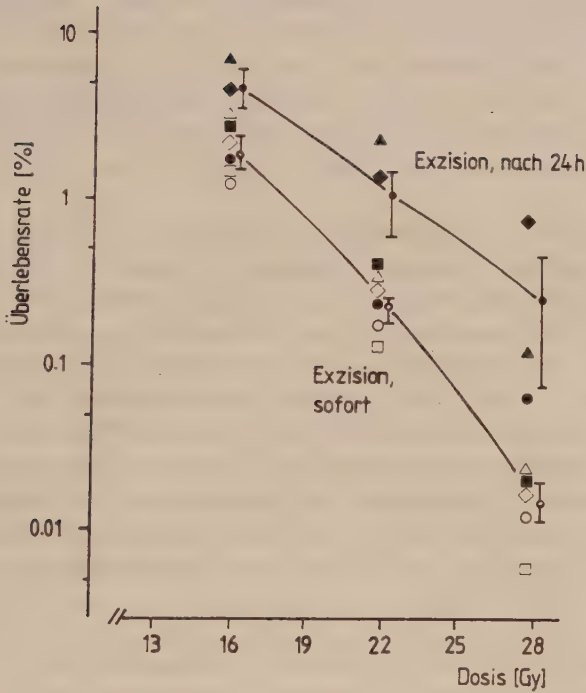


Abb. 9: PLD-Repair, Dosisabhängigkeit, unter hypoxischen Bedingungen

● Durchschnittswerte, Exzision nach 24 Stunden

○ Durchschnittswerte, Exzision sofort

△

◇

□

○

Einzelergebnisse

Die Tiere wurden mit 16, 22 oder 28 Gy hypoxisch bestrahlt. Die Exzision des Tumors erfolgte entweder sofort nach Behandlung (offene Symbole) oder 24 Stunden später (geschlossene Symbole).

Zeitabhängigkeit unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 7):  
Die Überlebensrate steigt zwischen 0 und 2 Stunden steil an, zwischen 2 und 6 Stunden nur noch leicht. Im Zeitraum zwischen 6 und 24 Stunden ist nochmals ein größerer Anstieg zu beobachten, aber die Steigung der Überlebensrate liegt unter der zwischen 0 und 2 Stunden

Zeitabhängigkeit unter ambienten Bedingungen (Abb. 8):  
Auch hier zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Überlebensrate zwischen 0 und 2 Stunden, danach sinkt die Überlebensrate kurzfristig (im Durchschnitt), um im Zeitraum zwischen 6 und 24 Stunden wieder zuzunehmen. Um Unterschied zu den Werten, die sich aus einer Bestrahlung mit 16,5 Gy ergeben, zeigen die Werte bei 18 Gy einen stärkeren Anstieg der Überlebensrate zwischen 0 und 2 Stunden, danach zeigen sie die gleichen Ergebnisse. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus 3.8.8. (Zeitabhängigkeit unter hypoxischen Bedingungen) zeigen die Ergebnisse unter ambienten Bedingungen eine geringere Reparaturrate.

Dosisabhängigkeit unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 9):  
Der Versuch zeigt, daß PLD-Repair dosisabhängig zu sein scheint: die deutlichste Erhöhung der Überlebensrate zeigt sich bei der höchsten Dosis.

#### 4. Diskussion

##### 4.1. Sauerstoffeffekt

###### 4.1.1. Historische Versuche

Bereits Schwarz (Schwarz, 1909), Holthusen (Holthusen, 1921) und Mottram (Mottram, 1936) konnten zeigen, daß die Strahlenwirkung in anoxischem Gewebe wesentlich geringer ist als bei guter Durchblutung. Dieser sogenannte Sauerstoffeffekt wurde erstmals von Gray (Gray, 1953) genauer untersucht. Er fand, daß ein bestimmtes Ausmaß an Strahlenwirkung, wie Chromosomenaberrationen in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen, Zelluntergänge in einer Gewebekultur und Wachstumshemmung eines soliden Tumors unter anoxischen Bedingungen eine doppelt und dreimal so hohe Strahlendosis braucht wie unter euoxischen Bedingungen. Gray konnte zeigen, daß es für die Wirkungsunterschiede entscheidend ist, welche Konzentration des im Gewebe gelösten Sauerstoffs zum Zeitpunkt der Bestrahlung vorliegt.

#### 4.1.2. K-Wert (Abhängigkeit des Sauerstoffeffekts von der Sauerstoffkonzentration)

Sauerstoff wirkt im Gewebe als Verstärkungsfaktor für die Strahlendosis, ausgedrückt als OER (oxygen enhancement ratio)(Read, 1952). Die Sensibilisierung hängt von der Sauerstoffkonzentration ab, wobei die maximale Wirkung meist schon in luftgesättigten Suspensionen erreicht wird.

Die Abhängigkeit des OER-Wertes von der Sauerstoffkonzentration läßt sich durch die sog.

"Alper-Formel" beschreiben:

$$S = S_N \cdot \frac{m[O] + k}{[O] + k}$$

S = Strahlenempfindlichkeit bei der Sauerstoffkonzentration [O]

$S_N$  = Strahlenempfindlichkeit in Stickstoff

m = maximaler OER-Wert

k = Konstante mit der Dimension Konzentration, die angibt, wann die Hälfte des maximalen Effekts erreicht ist.

(Alper, Howard-Flanders, 1956)

Bei Bakterien fanden Alper und Howard-Flanders (Alper, Howard-Flanders, 1956) einen k-Wert von 7,2  $\mu\text{M/l}$ . Für Säugetierzellen (menschliche Leberzellen) ergaben sich Werte von 8,5  $\mu\text{M/l}$  (Dewey, 1960). Um diesen Wert zu ermitteln, wurden Zellen in Suspension mit Gasen verschiedenen Partialdrucks equilibriert, bestrahlt und auf ihre reproduktive Integrität getestet. Es zeigte sich ein Verhältnis von 2,2 (Luft gegenüber Stickstoff).

Untersucht man die Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors (OER) über einen besonders weiten Bereich an Sauerstoffkonzentrationen, findet man einen maximalen OER von 3,1 und eine Sauerstoffkonzentration für halbmaximalen Effekt von 8  $\mu\text{M/l}$  (Elkind et al., 1965). Barendsen kam bei seinen Untersuchungen auf k-Werte von 7  $\mu\text{M/l}$  (Barendsen, 1961). Neuere Untersuchungen berichten von k-Werten von 8  $\mu\text{M/l}$  bei chinesischen Hamsterzellen (Kiefer, 1975).

#### 4.1.3. Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck

Die Radiosensitivität der Zellen sinkt nur wenig bis zu einem Sauerstoffdruck von 20 mm Hg; bei ungefähr 4 mm Hg Partialdruck wird sie auf die Hälfte ihres Wertes bei 100 % Sauerstoff (760 mm Hg) reduziert. Technisch ist es unmöglich, 100 % Anoxie zu erreichen (eine totale Abwesenheit von Sauerstoff), aber bereits bei einem Partialdruck von weniger als 0,01 mm Hg ist die Radioresistenz maximal, d. h., 2,5 bis 3mal so viel wie bei voll oxigenierten Zellen (Withers, Peters, 1980).

#### 4.1.4. Zeitabhängigkeit

Entscheidend ist, daß die Zellen vor Bestrahlung dem Sauerstoff ausgesetzt werden, wie Versuche mit hypoxischen Zellen zeigen. Michael und Harrop (Michael, Harrop, 1980) untersuchten die Zeitabhängigkeit mit Hilfe des Rapid-mix-Verfahrens genauer:

Eine sauerstofffreie Zellsuspension wird mit einer sauerstoffgesättigten Lösung unmittelbar vor und nach Bestrahlung gemischt. Durch entsprechende Anordnungen lassen sich Zeitauflösungen unter einer Millisekunde dadurch erreichen.

So konnte gezeigt werden, daß der Sauerstoff ca. 30 - 40 msec vor der Bestrahlung für die Zellen verfügbar sein muß (abhängig von der Sauerstoffkonzentration), um den vollen Sauerstoffeffekt zu erhalten. Wird nur 4 msec lang Sauerstoff zugeführt, bekommt man nur die Hälfte des Effekts. 5 msec nach Bestrahlung zugegebener Sauerstoff zeigt keinen Effekt mehr (Michael, Harrop, 1980).

#### 4.1.5. Stoffwechselabhängigkeit

Der Einfluß des Sauerstoffs spielt sich nicht auf zell-physiologischer Ebene ab (z. B. durch Inhibierung der Respiration):

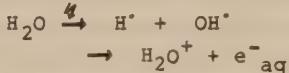
Vergleicht man atmungskompetente mit atmungsdefizienten Mikroorganismen, so zeigt sich kein Unterschied (Kiefer, 1981).

Gegen eine Stoffwechselabhängigkeit spricht auch der kurze Zeitraum, indem Sauerstoff vorhanden sein muß, um den vollen Effekt zu erhalten, eine Zeitspanne, in der keine Stoffwechselumstellung erfolgen kann. (Trott, 1983).

#### 4.1.6. Mechanismus

Man vermutet, daß der Mechanismus des Sauerstoffeffekts folgendermaßen abläuft:(Kiefer, 1981)

Die Absorption der Strahlung führt bei dem für den Strahlenschaden hauptsächlich verantwortlichen Molekül, dem Wasser, zu zwei verschiedenen chemischen Reaktionen:



Die Strahlung produziert beim Durchtritt durch die Materie eine Anzahl von Ionenpaaren. Diese Ionenpaare besitzen nur eine kurze Lebensdauer (ca.  $10^{-10}$  sec), sie produzieren aber wiederum freie Radikale, die wieder mit anderen Molekülen reagieren.

Zu einem Großteil sind es diese Radikale, die chemische Bindungen brechen und chemische Veränderungen an den Biomolekülen produzieren, was sich endgültig als biologischer Schaden ausdrückt.

Wenn Sauerstoff anwesend ist, reagiert er mit dem freien Radikal  $\text{R}^\bullet$ . Diese Reaktion produziert  $\text{ROO}^\bullet$ , ein organisches Peroxidradikal, das nicht mehr restituieren kann wie das  $\text{R}^\bullet$ .



#### 4.2. Hypoxie in Tumoren

Ein generelles Merkmal von malignem Wachstum ist die Einschränkung der Versorgung mit Sauerstoff und Substraten bei zunehmendem Tumorgewicht. Der Grund liegt in einer Verringerung der Vaskularisierungsdichte mit fortschreitendem Tumorstadium, die mittleren Interkapillardistanzen, Kapillarlängen und Kapillardurchmesser vergrößern sich deutlich. Das führt zu einer Verschlechterung des konvektiven und diffusiven Transports mit Auswirkungen sowohl auf die nutritive Versorgung und Entsorgung wie auch auf die Versorgung mit Sauerstoff. (Müller-Klieser, Vaupel, 1983).

Obwohl die Bedeutung der Sauerstoffversorgung für die Strahlentherapie schon seit Schwarz (Schwarz, 1909) bekannt ist, konnte erst in letzter Zeit durch Anwendung von Mikrotechniken wie sauerstoffempfindlicher Mikroelektroden oder der Kryophotometrie der Oxygenierungsgrad von soliden Tumoren direkt erfaßt werden und diejenigen Faktoren untersucht werden, durch die die Oxygenierung beeinflusst wird (Müller-Klieser, Vaupel, 1983).

Folgende Faktoren beeinflussen die Oxygenierung in einem soliden Tumor:

1. Tumorgröße, bzw. Tumorstadium:

Mit Hilfe von Sauerstoffmikroelektroden konnte Vaupel (Vaupel, 1974) zeigen, daß der mittlere Sauerstoffpartialdruck mit zunehmendem Tumorgewicht exponentiell absinkt. Auch die Bestimmung der  $\text{HbO}_2$ -Sättigung in Tumormikrogefäßen mit Hilfe der Kryophotometrie führte zu Ergebnissen, die eine verringerte Sauerstoffversorgung mit zunehmender Tumorgröße annehmen lassen (Müller-Klieser et al., 1980), da die mittlere Sauerstoffbeladung der Erythrozyten in Tumormikrogefäßen mit zunehmendem Tumorgewicht absinkt.

2. Ort des Tumorstadiums:

Mit Hilfe von Kryophotometrie fand man, daß Tumoren derselben Zelllinie, an verschiedenen Orten implantiert, große Unterschiede in der Sauerstoffversorgung zeigen. Das ist, zumindest teilweise, auf die Verschiedenheit der jeweiligen Gefäßmuster zurückzuführen. (Müller-Klieser et al., 1980; Otte et al., 1982).

3. Zellart:

Ebenfalls mit Hilfe von Kryophotometrie zeigten sich große Unterschiede der  $\text{HbO}_2$ -Sättigung in Tumoren, wenn verschiedene Zelllinien implantiert wurden (Müller-Klieser et al., 1982).

Der Grund sind Unterschiede in der Vaskularisation. Es müssen aber auch Unterschiede des spezifischen Sauerstoffverbrauchs als Erklärung in Betracht gezogen werden. (Müller-Klieser, Sutherland, 1982).

4. Auch arterio-venöse Shunts beeinflussen die Tumoroxygenierung:

Aufgrund dieser Tatsache kann man den Sauerstoffpartialdruck errechnen und kommt zu einem Wert von 14 mm Hg am venösen Ende der nutritiven Gefäße, ein Wert, den man tatsächlich im Tumorgewebe vorfindet (Vaupel, 1979).

5. Zusätzlich kann die Vaskularisierungsdichte und damit die Sauerstoffversorgung von Malignomen individuellen Schwankungen unterliegen. Da zeigte sich bei Messungen der  $\text{HbO}_2$ -Sättigung bei menschlichen Tumoren der gleichen Zellart und gleicher Lokalisation (Müller-Klieser et al., 1981).

Aufgrund der unterschiedlichen Oxygenierung durch die eben genannten Faktoren können die Tumorzellen in Subpopulationen bezüglich ihrer Sauerstoffversorgung unterteilt werden:

Es gibt zwei Klassen von Zellen, die teilungsfähig, gut mit Sauerstoff versorgt und solche, die aufgrund ihres Sauerstoffmangels teilungsunfähig oder tot sind, die anoxischen oder nekrotischen Zellen.

Zwischen diesen beiden Extremen existiert eine dritte Klasse von Zellen, die in einem Bereich liegen, in dem die Sauerstoffkonzentration hoch genug ist, um die Zellen klonogen zu halten, aber gering genug ist, um an den Zellen eine deutliche Resistenzsteigerung gegenüber den euoxischen Zellen hervorzurufen. Von diesen sog. hypoxischen Zellen kann aufgrund ihrer höheren Resistenz ein Rezidivwachstum nach einer Strahlentherapie ausgehen (Hall, 1982).

Es ist deshalb von größtem Interesse, ihr Verhalten genauer zu untersuchen.

#### 4.2.1. Einfluß physiologischer Faktoren

##### 4.2.1.1. Temperatur

Anästhesie ist stets mit dem Verlust der Fähigkeit zur Temperaturregulation verbunden, so daß der Körper sehr schnell die Umgebungstemperatur annimmt. Durch unterschiedlich warme Wasserbäder (25, 31 und 37 °C) läßt sich die Körpertemperatur während der Bestrahlung beeinflussen.

Untersucht man nach einer solchen Behandlung die Überlebensrate der Tumorzellen nach Bestrahlung, zeigt sich nach Abkühlung eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit. Je kleiner die Dosis gewählt wird, desto stärker zeigt sich der Unterschied der Strahlenempfindlichkeit bei verschiedener Temperatur (vgl. Abb. 5): bei 12 Gy zeigt sich der deutlichste Effekt. Auch Buschmann und Trott (1986) kamen zu ähnlichen Versuchsergebnissen. Sie bestrahlten Mäuse, die mit Hexobarbital narkotisiert worden waren, bei 18°C, 22°C und 35°C und untersuchten mit der Methode der Wachstumsverzögerung die Überlebensraten. Auch bei diesen Versuchen zeigte sich eine deutliche Zunahme der Strahlenempfindlichkeit nach Abkühlung der Tiere. Bei Buschmann und Trott wurden die Tiere nicht nur ambient, sondern auch hypoxisch bestrahlt (der Tumor ist dabei abgeklemmt). Dabei zeigte sich ein nur relativ geringer Einfluß der Temperatur auf die Strahlenreaktion der Tumorzellen.

Ein Vergleich beider Versuche zeigt, daß die Hauptursache für die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der unterschiedliche Anteil hypoxischer Zellen im Tumor ist. Eine Abkühlung führt zu einer Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit und somit zu einer Verminderung der hypoxischen Fraktion. Dies wäre möglicherweise zu erklären durch eine Verminderung des Sauerstoffverbrauchs im Tumor und einer Zentralisation des Kreislaufs in den Körperkern und den Tumor (der keine Vasokonstriktion wie die anderen peripheren Gewebe durchführen kann) (Buschmann, Trott, 1986).

#### 4.2.1.2. Narkose

Werden die Tiere mit Hexobarbital narkotisiert und wird dann die Überlebensrate der Tumorzellen gemessen, so liegt sie deutlich über den Werten, die bei nichtnarkotisierten Tieren gemessen wurden. Das Narkotikum erhöht die Überlebensrate, die Zellen werden strahlenunempfindlicher, das bedeutet, daß offensichtlich die hypoxische Fraktion zunimmt. (Nur das Verhältnis der hypoxischen Zellen wird bei einem Versuch unter ambienten Bedingungen erfaßt, da diese eine Behandlung unter ambienten Bedingungen überleben). Dieses Phänomen könnte darauf zurückzuführen sein, daß Narkose generell die Blutzirkulation vermindert und so eine geringere Menge Sauerstoff für den Tumor zur Verfügung steht. Cullen und Walker (Cullen, Walker, 1983) kommen mit in vivo-in vitro Versuchen am RIF-1 Tumor zu ähnlichen Ergebnissen: Anästhesie mit Pentobarbiton bewirkt ein Anwachsen der hypoxischen Fraktion. Vergleicht man diese Werte mit Punkt 4.2.3.1. Temperatur, erhält man zwei sich widersprechende Aussagen:

1. Werden die Tiere narkotisiert und senkt man gleichzeitig künstlich die Temperatur, so erhält man bei niedrigen Temperaturen eine kleine hypoxische Fraktion.
2. Werden die Tiere narkotisiert und warm gehalten, steigt die hypoxische Fraktion an gegenüber nicht narkotisierten Tieren.

Punkt 2 steht im Gegensatz zu Punkt 1, da unter Narkose die Temperatur des Tieres absinkt und es deshalb nur (nach Punkt 1) eine kleine hypoxische Fraktion geben dürfte. Beide Punkte sind nur in Einklang zu bringen, postuliert man zwei unterschiedliche Mechanismen:

Bei Punkt 1 wird die hypoxische Fraktion allein durch die Temperatur beeinflusst. Bei Punkt 2 müßte dieser Temperatureffekt ebenfalls auftreten. Er wird aber überlagert durch die Wirkung der Anästhesie. Dies wäre durch eine bereits in Kapitel 4.2.3.1. erwähnte Verminderung des Sauerstoffverbrauchs und einer Zentralisation des Kreislaufs in Körperkern und Tumor zu erklären.

#### 4.2.1.3. Sauerstoffsättigung

Atmen die Tiere reinen Sauerstoff anstelle von Luft, sinkt die Überlebensrate, mehr Zellen werden geschädigt im Vergleich zu Luftatmung. Die höchste Überlebensrate zeigen Versuche bei denen die Tiere 5 % Sauerstoff und 95 % Stickstoff einatmen. Im Vergleich dazu werden die Zellen mehr geschädigt, läßt man die Tiere 10, bzw. 15 % Sauerstoff einatmen. Denselben Effekt, je höher konzentriert die Tiere Sauerstoff einatmen, desto größer ist die Zellschädigung nach Bestrahlung, beobachteten schon Wright und Howard-Flanders (Wright, Howard-Flanders, 1957) bei Versuchen mit jungen Mäusen. Durch diese Form der Behandlung steht den Zellen und damit auch dem Tumor offenbar mehr Sauerstoff zur Verfügung, die Anzahl der hypoxischen Zellen nimmt ab, die Zellen sind strahlenempfindlicher.

Dieser Sauerstoffeffekt kann auch durch eine Veränderung der Anzahl der sauerstofftragenden Zellen untersucht werden. Hirst et al. (Hirst, Hazlehurst, Brown, 1984) veränderten bei Mäusen den Anteil der Erythrozyten im Blut (Haematokrit = Anteil der Erythrozyten am Volumen des peripheren Blutes). Sie untersuchten danach die Radiosensitivität des EMT 6, KHT und RIF 1 Tumors:

Akute Reduktion des Hämatokrits (Anämie) führte zu reduzierter Strahlenempfindlichkeit, Ansteigen des Hämatokrits bewirkte ein Ansteigen der Empfindlichkeit.

#### 4.3. Reoxygenierung

Die ersten Versuche zur Reoxygenierung wurden von Van Putten und Kallman durchgeführt (Van Putten, Kallman, 1968). Sie bestrahlten ein Mäusesarkom 5 Tage lang mit 1,9 Gy. Bei einem Vergleich des Anteils der hypoxischen Zellen eines unbehandelten Tumors mit der Proportion des behandelten Tumors zeigte es sich, daß beide gleich waren. Das heißt, daß ein Teil der hypoxischen Zellen während der Therapie in den oxischen Zustand übergehen muß: wäre das nicht so, müßte sich die Anzahl der hypoxischen Zellen nach Bestrahlung ändern. Da die gut mit Sauerstoff versorgten Zellen durch Bestrahlung abgetötet werden, würden nun die übrigbleibenden hypoxischen Zellen einen größeren Prozentsatz stellen, was aber durch den Versuch widerlegt wurde. Kallman (Kallman, 1972) schlägt folgende Mechanismen zur Erklärung dieses Phänomens vor. Er geht davon aus, daß ein Tumor in drei verschiedene Zonen unterteilt werden kann (bei einer Größe von mehr als 200  $\mu$  Radius). Die zentrale Zone enthält nekrotische Zellen, darauf folgt eine Zone mit intakten Zellen, die ungefähr 100  $\mu$  dick ist und einer Stromazone, die peripher zur außen liegenden Zellschicht sich befindet. Der Tumor wird durch Kapillaren mit Sauerstoff versorgt. Wird der Tumor bestrahlt, so wird ein Teil der Zellen tödlich getroffen. Für die anschließende Reoxygenierung der überlebenden Zellen werden vier mögliche Mechanismen diskutiert:

##### 1. Reduzierter Sauerstoffmetabolismus

Möglicherweise verbrauchen die durch Bestrahlung sterilisierten Zellen weniger Sauerstoff, so daß für die übrigen Zellen mehr davon zur Verfügung steht, ohne daß das Gefäßsystem geändert wird.

##### 2. Verbesserte Zirkulation

Durch verbesserte Zirkulation wird eventuell mehr Blut in den Kapillaren transportiert und somit mehr Sauerstoff.

### 3. Schrumpfung

Wenn die Schrumpfung des Tumors sehr schnell nach Bestrahlung erfolgt, könnten die nicht veränderten peripheren Kapillaren sich nach innen ausrichten und dort die Sauerstoffzufuhr verbessern.

### 4. Migration

Überlebende Zellen könnten aus hypoxischen Zonen in Bereich mit verbesserter Sauerstoffversorgung wandern.

Eigene Versuche mit dem SSK 2 Tumor zeigen, daß die Fraktion der hypoxischen Zellen nach Verabreichung der ersten Dosis zunächst relativ rasch abnimmt:

bereits nach vier Stunden sind von ursprünglich 90 - 100 % (Kummermehr, mündliche Mitteilung) der hypoxischen Zellen nur noch 31,7 % übrig. Betrachtet man sich aber die Werte nach 24 Stunden, so erhält man immer noch 19,5 % hypoxische Zellen. Das kann nicht darauf zurückzuführen sein, daß die oxischen Zellen langsam sterben, und so erst allmählich Sauerstoff für die hypoxische Fraktion zur Verfügung steht, da eine relativ schnelle Reoxygenierung bereits in den ersten vier Stunden stattfindet.

Eventuell liegt die Ursache in der Untersuchungsmethode:

McNally (McNally, 1973) vermutet, daß die Zellen bei der in vivo-in vitro Methode durch Explantation gerettet werden: Nach Bestrahlung gibt es im Tumor nur noch hypoxische Zellen, ein Teil der Zellen reoxygeniert, ein anderer Teil stirbt ab aufgrund der Hypoxie. Werden die Zellen nach Behandlung in Zellkultur gegeben, finden sie bessere Bedingungen vor als im Tumor. Zellen, die unter normalen Bedingungen abgestorben wären, erholen sich wieder. So wäre es zu erklären, wieso nach 24 Stunden immer noch ca. 20 % der Zellen hypoxisch sind.

#### 4.4. PLD-Repair

PLD-Repair (Erholung von potentiell letalem Strahlenschaden) konnte erstmals durch in vitro Versuche an Tumorzellen nachgewiesen werden (Little et al., 1973). Little hielt LICH-Zellen (Chang human liver cells) nach Bestrahlung für mehrere Stunden in der Plateauphase und konnte durch diese Behandlung eine deutlich erhöhte Zellüberlebensrate zeigen. (In der Plateauphase findet keine Zellvermehrung mehr statt. Die Zellen befinden sich größten Teils in der  $G_1$ -Pase des Zellzyklus. Das Kulturmedium ist verbraucht). Auch drastischere Maßnahmen wie Halten der Zellen bei niedriger Temperatur ( $5^{\circ}\text{C}$ ), Zugabe von Cycloheximid (Inhibitor der Proteinsynthese), stundenlange Inkubation in einem Überschuß von Thymidin ( $10^{-4}\text{M}$ ), jeweils nach Bestrahlung durchgeführt, hatten denselben Effekt:

Die Überlebensrate stieg an gegenüber 'normaler' Behandlung. Von den eben zitierten Maßnahmen ist nur die erste für die Zellen auch in vivo zu erwarten. Es gibt sicher Bereiche im Tumor, in denen die Zellen schlecht mit Nährstoffen versorgt sind und die deshalb die Eigenschaft von Plateauphasezellen zeigen.

Es lag deshalb nahe, PLD-Repair als üblichen Erholungsprozeß in vivo anzunehmen.

Little (Little et al., 1973) zeigte am NCTC-Mäusefibrosarkom (Messungen der Wachstumsrate), daß seine in vitro-Ergebnisse mit in vivo-Versuchen übereinstimmten: beide Male war PLD-Erholung festzustellen.

Offensichtlich findet in einem Tumor eine Erholung von potentiell letalen Strahlenschäden durch sich nicht teilende oder nur langsam proliferierende Zellen statt.

Ein Jahr nach den Versuchen von Little wurden mit Hilfe der in vivo-in vitro-Technik Versuche am NCTC-Tumor und am EMT 6 Mammarkarzinom gemacht. (Hahn et al., 1974).

Bestrahlte man die Tumoren im Tier, wartete dann 6 bis 24 Stunden bis zur Exzision, so konnte man ebenfalls eine höhere Überlebensrate zeigen. Offensichtlich ist es den Zellen möglich, einen strahleninduzierten, potentiell letalen Strahlenschaden in situ zu reparieren; findet aber die Tumorexzision sofort nach Bestrahlung statt, wird dieser Prozeß inhibiert. Bestrahlt man mit Dosen von 5 Gy oder darunter, zeigt sich keine Erholung. Da man weiß, daß mitotische Aktivität bei Dosen von mehr als 5 Gy gehemmt wird, schloß Hahn (Hahn et al., 1974), daß am Erholungsprozeß primär nichtproliferierende und teilweise hypoxische Zellen beteiligt sind. Das stimmt mit entsprechenden in vitro-Versuchen überein:

Chinesische Hamsterzellen zeigen keine Erholung während des exponentiellen Wachstums, wenn sie nach Bestrahlung in isotonischen Puffer gegeben werden, während Plateauphaszellen PLD-Reparatur durchführen. (Hahn et al., 1974).

PLD-Repair muß besonders bei Versuchen mit fraktionierter Bestrahlung berücksichtigt werden. Läßt man die Zellen nach Behandlung im Tier, um zu einem späteren Zeitpunkt eine zweite Dosis zu verabreichen, so wird ein Teil der Strahlenschäden innerhalb 24 Stunden repariert. Erfolgt die Exzision des Tumors dagegen sofort nach Bestrahlung, erhält man eine geringere Überlebensrate der Zellen als in vivo tatsächlich vorliegen würde.

#### 4.4.1. PLD-Repair und Zeitabhängigkeit

Meine Versuche zeigen sowohl unter ambienten als auch unter hypoxischen Bedingungen eine eindeutige Zeitabhängigkeit. Unter hypoxischen Bedingungen ist eine gegenüber ambienten Bedingungen leicht erhöhte PLD-Repairrate festzustellen (vgl. Abb. 7 und 8). Es zeigt sich zwischen 0 und 2 Stunden ein starker Anstieg der Überlebensrate, ein nur leichter Anstieg zwischen 2 und 6 Stunden, um dann nochmals im Intervall bis 24 Stunden deutlich zuzunehmen.

Auch die Kurve unter ambienten Bedingungen zeigt anfangs einen steilen Anstieg zwischen 0 und 2 Stunden, geringer Anstieg zwischen 2 und 6 Stunden und wieder Erhöhung bis 24 Stunden.

Auffallend ist bei meinen Ergebnissen ein 'Knick' der Erholung zwischen 2 und 6 Stunden. Eventuell ist dieser Knick sowohl unter hypoxischen wie auch unter ambienten Bedingungen ein Hinweis auf ein zweites Reparatursystem, das erst nach 6 Stunden einsetzt. Auf Ähnliches verweist Pohlit (Pohlit, Heyder, 1981). Sie untersuchten Ehrlich-Aszites-Tumorzellen und zeigte, daß PLD-Repair schon innerhalb einer Stunde nach Bestrahlung abgeschlossen ist (alpha-PLD). Ein zweites Reparatursystem dagegen arbeitet mehrere Stunden (beta-PLD). Pohlit postuliert deshalb zwei zusammenhängende, zeitlich getrennt ablaufende Reparatursysteme.

Im Gegensatz dazu stehen Little, Hahn und Evans:

Little (Little et al., 1973) fand bei NCTC-Aszites-Tumoren, daß nach 2 Stunden 50 % des Repairs durchgeführt war, komplett war die Erholung nach 4 - 6 Stunden. Langsamer verlief dagegen die Reparatur, untersuchte er einen soliden NCTC-Tumor: die meisten Schäden wurden hier innerhalb von 6 Stunden repariert, aber die Reparaturrate stieg noch bis zu 24 Stunden leicht an.

Hahn (Hahn et al., 1974) zeigte bei in vivo Versuchen mit dem NCTC Fibrosarkom, daß die Erholungsrate innerhalb 6 Stunden steil ansteigt, um dann bis zu 12 Stunden (es wurden nur 12 Stunden Intervalle untersucht) gleich zu bleiben. Das gleiche Ergebnis zeigte ein in vitro-Versuch mit HA-Zellen (Zellen des chinesischen Hamsters).

Ebenfalls chinesische Hamsterzellen verwendete Evans (Evans et al., 1984) bei in vitro Versuchen. Auch er konnte einen steilen Anstieg der Rate innerhalb der ersten 6 Stunden zeigen, sie blieb dann innerhalb 24 Stunden gleich.

Little, Hahn und Evans kommen zu fast gleichen Ergebnissen: kein Knick, sondern stetiger Anstieg innerhalb von 6 Stunden, danach kaum mehr Reparatur. Bei ihren Untersuchungen fällt auf, daß sowohl Little wie auch Hahn den NCTC-Tumor untersuchten, Hahn und Evans HA-Zellen.

Es könnte sein, daß es sich zwar bei allen Zellen um PLD-Repair und eine gewisse Zeitabhängigkeit handelt, aber es durchaus Unterschiede innerhalb der Zelllinien gibt. So wäre es zu erklären, daß z. B. Little und Hahn bezüglich dem NCTC-Tumor zum gleichen Ergebnis kommen, dieses aber völlig verschieden ist zu meinen eigenen Versuchen.

#### 4.4.2. PLD-Repair und Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck

Bei den eigenen Versuchen zeigte es sich, daß sowohl unter ambienten als auch unter hypoxischen Bedingungen PLD-Reparatur auftritt. Vergleicht man beide miteinander, so ist ein stärkerer Anstieg der Reparaturrate unter hypoxischen Bedingungen, also bei euoxischen Zellen zu beobachten.

McNally und Sheldon (McNally, Sheldon, 1977) kamen bei Versuchen mit dem MT Tumor zu dem Ergebnis, daß eine Erholung von PLD nur bei chronisch hypoxischen Zellen stattfindet, nicht aber bei oxischen Zellen, die durch Abklemmen entweder kurzfristig hypoxisch gemacht wurden oder ohne Abklemmen bestrahlt wurden. Zu dem gleichen Ergebnis kommen Sheldon und Fowler (Sheldon, Fowler, 1985). Die entgegengesetzten Ergebnisse können nicht auf die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden zurückgeführt werden, denn alle Versuche wurden mit der in vivo-in vitro-Methode gemacht.

PLD-Repair tritt immer dann auf, wenn die Zelle ungünstigen Bedingungen ausgesetzt ist (Nahrungsmangel). Für den Stoffwechselvorgang würde daher keine Energie verbraucht werden, sie stände deshalb für Reparaturvorgänge zur Verfügung. Dieser mögliche Mechanismus ist aber bei ambienten Zellen logischer als bei hypoxischen Zellen. Hypoxische Zellen sind aufgrund der mangelnden Sauerstoffversorgung vermutlich in ihren Funktionen eingeschränkt und es ist deshalb nicht unbedingt anzunehmen, daß sie PLD-Repair ebenso optimal durchführen können wie ambiente Zellen.

#### 4.4.3. PLD-Repair und Dosisabhängigkeit

Die eigenen Versuche zeigen, je höher die Dosis ist, desto höher ist auch die Überlebensrate, wenn der Tumor 24 Stunden im Tier verbleibt. Je mehr Schäden durch hohe Dosen gesetzt werden, desto mehr wird offensichtlich repariert. Das würde aber auch bedeuten, daß es sich bis in den hohen Dosisbereich hinein um ein relativ ungesättigtes Reparatursystem handelt. Unterstützt werden die eigenen Daten durch Arbeiten von Little (Little et al., 1973) mit in vitro-Versuchen an LICH Zellen und Versuchen von Evans (Evans, 1984) mit chinesischen Hamsterzellen. Beide Arbeiten belegen eine eindeutige Dosisabhängigkeit. Pohlitz (Pohlitz, Heyder, 1981) vermutet aufgrund von Arbeiten mit Ehrlich-Aszites-Tumorzellen zwei Reparatursysteme: eines arbeitet nur eine Stunde lang nach Setzen des Schadens, er nennt es 'gesättigtes', das zweite arbeitet mehrere Stunden und wird deshalb 'ungesättigt' genannt. Vermutlich handelt es sich bei seinem 'ungesättigten' System um das gleiche, das auch bei eigenen Versuchen für die Dosisabhängigkeit verantwortlich ist.

#### 4.4.4. Mechanismus

Vermutlich läuft der PLD-Repair nicht ohne Enzyme ab; einen Hinweis darauf gibt die von Evans (Evans et al., 1974) festgestellte Temperaturabhängigkeit. Er untersuchte chinesische Hamsterzellen, inkubierte sie bei unterschiedlichen Temperaturen (37, 25 und 4°C) und konnte einen Abfall der Repairrate entsprechend dem Sinken der Temperatur feststellen (25 und 4°C sind Temperaturen, bei denen Enzyme kaum noch oder überhaupt nicht mehr aktiv sind). In diesem Zusammenhang muß auch ein Versuch gesehen werden, den Huet und Laval durchführten (Huet, Laval, 1985). Bei chinesischen Hamsterzellen konnten sie nachweisen, daß PLD-Repair nur unter Anwesenheit von poly(ADP-ribose) abläuft. Bei diesem Molekül wird vermutet, daß es an der Reparatur von DNA-Brüchen beteiligt ist (Huet, Laval, 1985). Werden die Bedingungen, unter denen PLD-Repair auftritt, genauer untersucht, fällt seine Abhängigkeit vom Stoffwechsel auf:

Hohe Zelldichte, d. h. meist Nahrungsmangel, ist ausschlaggebend, ob Erholung stattfindet oder nicht (Evans et al., 1974). Zusammenhängend damit scheint auch Zell-Zell-Kontakt notwendig zu sein. Nahrungsmangel kann künstlich erzeugt werden, gibt man die Zellen in konditioniertes Medium, d. h. verbrauchtes Medium. Auch hier erhält man deutlich PLD-Repair. (Evans et al., 1974).

Zu diesen Faktoren kommt noch eine Abhängigkeit vom Wachstumszustand der Zellen hinzu:

Befinden sich die Zellen in der späten Soder in der G1-Phase, steigt die Reparaturrate (Hetzl et al., 1976). Während der Periode der Synthese werden offensichtlich gleichzeitig Schäden am parentalen DNA-Strang repariert.

Dies steht im Einklang mit den Befunden von Little und Zinner (Little et al., 1973; Zinner, Little, 1973): sie konnten an Aszites und soliden Tumoren zeigen, daß junge, schnell wachsende Tumoren weniger reparieren als ältere, große, langsam proliferierende Tumoren.

Als letztes soll noch ein Vergleich zwischen Röntgen- und Neutronenbehandlung angeführt werden. Wurden Tumoren mit Neutronen bestrahlt, so fand Urano (Urano et al., 1976) bei seinen Untersuchungen in vivo am NR-S1 Karzinom der Maus keine Reparatur, Rasey (Rasey et al., 1978) konnte am EMT 6 Tumor eine stark verminderte Reparaturrate feststellen.

Geringe oder überhaupt keine Reparatur bei Neutronenbestrahlung steht im Einklang mit Befunden über SLD-Repair: auch diese Form der Erholung findet unter Neutronenbestrahlung nicht statt. Offensichtlich verhindert die erhöhte Ionisationsdichte der Neutronen im Gewebe die Reparatur allgemein, der lokale Strahlenschaden ist so ausgedehnt, daß Reparatur nicht mehr möglich ist.

#### 4.5. Hypoxie bei menschlichen Tumoren

Gray vermutete schon 1953 (Gray et al., 1953), daß Hypoxie die Ursache der Radioresistenz bei bestimmten Tumoren ist. Seit dieser Zeit gibt es mehrere Hinweise auf hypoxische Bereiche in menschlichen Tumoren. Für den direkten Nachweis gibt es aber bis heute nur wenige Methoden und Techniken, die speziell auf den menschlichen Tumor angewendet werden können. Einen möglichen Fortschritt bringen Untersuchungen mit chemischen Verbindungen, die sich spezifisch an hypoxische Zellen binden (Chapman et al., 1981). Chapman zeigte, daß ein reduzierter Metabolit von Misonidazol sich an hypoxische Regionen von Sphäroiden bindet. Diese Bereiche können durch Autoradiographie identifiziert werden, wenn man ( $^{14}\text{C}$ )misonidazol verwendet. Auch fluoreszierende Derivate können sinnvoll sein: Begg (Begg, A. C. et al., unveröffentlicht) verwendete Nitroakridin, das durch Reduktion fluoresziert und eine stabile Bindung mit hypoxischen Zellen eingeht. Misonidazol sowie Metronidazol wirken wie der Sauerstoff als Elektronenakzeptor; führt also auch zur Strahlensensibilisierung (Hall, 1978). Eine Bindung an diese Stoffe macht also gewissermaßen aus einer hypoxischen Zelle eine euoxische. Entsprechend vermutete man, die hypoxische Fraktion eines Tumors damit zu senken. Die erste Therapie mit diesen chemischen Radiosensibilisatoren am Patienten wurde von Urtasun mit Metronidazol durchgeführt (Urtasun, 1976). Schon bald stellte sich aber heraus, daß die Behandlung zu neurotoxischen Nebeneffekten führt. Man versuchte es mit Misonidazol, das im Tierexperiment sehr gute Ergebnisse erzielt. Beim Menschen können aufgrund der Toxizität nur sehr kleine Mengen verabreicht werden. Bis jetzt konnte nur bei einem Bronchialkarzinom eine erfolgreiche Therapie durchgeführt werden (Dische, 1983).

Eine Methode mit mehr Aussicht auf Erfolg erschien die Behandlung unter Sauerstoffüberdruck. Bereits 1955 wurde von Churchill-Davidson (Churchill-Davidson et al., 1955) eine Kammer konstruiert, in der man eine Behandlung unter Sauerstoffüberdruck durchführen kann. Es gibt heute bereits Daten von Patienten mit Kopf- und Halstumoren sowie Cervixkarzinomen, die mit hyperbaren Sauerstoff behandelt wurden. Dabei zeigt sich eine gute Heilungsrate bei den Kopf- und Halstumoren, bei den Cervixkarzinomen wurde bisher keine erfolgreiche Behandlung nachgewiesen (Dische, 1982). Um in diesem Bereich weitere Erfolge erzielen zu können, ist es unerlässlich, die Reaktionen hypoxischer Zellen im bestrahlten Tumor noch genauer zu untersuchen. Nur wenn das Verhalten dieser Zellen im Tiermodell genau bekannt ist, können Schlüsse auf den menschlichen Tumor gezogen werden und auch Unterschiede zwischen Tiermodellen und den Reaktionen menschlicher Tumoren berücksichtigt werden.

## 5. Zusammenfassung

Die Versuche zur Untersuchung hypoxischer Zellen im SSK-2-Fibrosarkom der Maus wurden mit der in vivo-in vitro Methode durchgeführt. Die Zellen können dabei in ihrer natürlichen Umgebung behandelt, aber trotzdem einzeln untersucht werden.

Der hypoxische Anteil der Zellen im SSK 2-Tumor beträgt 40 % und wurde nachgewiesen durch einen Vergleich der Dosiseffektkurven unter ambienten und hypoxischen Bestrahlungsbedingungen. Er hängt sehr stark von verschiedenen Einflüssen ab.

Senkt man bei einem Tier die Körpertemperatur (bis 25 °C), so nimmt die Strahlenempfindlichkeit der Zellen zu, was auf eine Verringerung der hypoxischen Fraktion schließen läßt. Je kleiner die Dosis gewählt wird, desto stärker ist der Unterschied der Strahlenempfindlichkeit bei verschiedener Temperatur.

Den entgegengesetzten Effekt erhält man, wenn man die Überlebensrate der Zellen narkotisierter Tiere mit denen nichtnarkotisierter Tiere vergleicht. Die Strahlenempfindlichkeit sinkt bei Narkose, obwohl gleichzeitig im narkotisierten Tier die Temperatur sinkt und dies sich gegenseitig aufheben müßte.

Läßt man die Tiere reinen Sauerstoff atmen, wird die Strahlenempfindlichkeit der Zellen erhöht, je geringer der Sauerstoffanteil der Atemluft ist (15 %, 10 %, 5 %), desto stärker nimmt die Strahlenempfindlichkeit ab.

Bestrahlt man die Zellen des SSK 2-Tumors fraktioniert, nimmt der Anteil der hypoxischen Zellen innerhalb vier Stunden rasch ab, eine geringere Abnahme ist im Zeitraum zwischen 4 - 24 Stunden zu beobachten.

Ein wichtiger Faktor, der bei der Untersuchung von Reoxygenierung berücksichtigt werden muß, ist die Erholung vom potentiell letalen Strahlenschaden (PLD-Repair). Sie tritt stärker auf unter hypoxischen als unter ambienten Bedingungen . Reparaturreffekte sind bis zu 24 Stunden nach Bestrahlung zu beobachten, wobei die Hauptaktivität zwischen 0 und 2 Stunden liegt. PLD-Repair ist eindeutig dosisabhängig, je höher die Dosis ist, desto umfangreicher findet Erholung statt.,

## 6. Literatur

Alper, T.; Howard-Flanders, P.:

Role of oxygen in modifying the radiosensitivity of E.Coli B.  
Nature 178: 978 - 979 (1956)

Barendsen, G. W.:

Damage to the reproductive capacity of human cells in tissue culture by ionizing radiations of different linear energy transfer. The initial effects of ionizing radiations.

In: Harris, R. J. C. (ed.), Academic Press, New York (1961)

Barendsen, G. W.:

Analysis of tumour response by excision and in vitro assay of cellular clonogenic capacity.

Brit. J. Cancer 41: 209 - 216 (1980)

Born, R., Hug, O.; Trott, K.-R.:

The effect of prolonged hypoxia on growth and viability of chinese hamster cells.

Int. J. Rad., Onc., Biol., Phys. 1: 687 - 697 (1976)

Buschmann, J.; Trott, K.-R.:

Der Einfluß von Anästhesie und Körpertemperatur auf die Strahlenempfindlichkeit des Adenokarzinoms 284 der C3H-Maus. Strahlentherapie (1986) (in Druck)

Chapman, J. D.; Franko, A. J.; Sharplin, J.:

A marker for hypoxic cells in tumours with potential clinical applicability.

Brit. J. Cancer 43: 546 - 550 (1981)

Churchill-Davidson, J.; Foster, C. A.; Wiernik, G.;

Collins, C. D.; Pizey, N. C. D.; Skeggs, D. B. L.;

Purser, P. R.:

The place of oxygen in radiotherapy.

Brit. J. of Radiology 39: 321 - 331 (1966)

Cullen, B.; Walker, H.:

Anaesthesia, blood pressure and hypoxia.

Medical Research Council: Cyclotron unit:

Annual Research and Development Report 1983, London (1983)

Dewey, D. L.:

Effect of oxygen and nitric oxide on the radiosensitivity of human cells in tissue culture.

Nature 186: 780 - 782 (1960)

Dische, S.:

Hyperbaric oxygen: the medical research council trials and their clinical significance.

Brit. J. of Radiology 51: 888 - 894 (1979)

Dische, S.:

The clinical use of hyperbaric oxygen and chemical hypoxic cell sensitizers.

In: Steel, G. G.; Adams, G. E.; Peckham, M. J. (ed.):

The Biological Basis of Radiotherapy, Elsevier, Amsterdam (1983)

Dische, S.:

Clinical trials with hypoxic cell sensitizers - the European experience.

Proc. 13th Int. Cancer Cong., Seattle, W. A.,

Sept. 8th - 15th, 1982 (1982)

Elkind, M. M.; Swain, R. M.; Alescio, T.; Sutton, H;

Moses, W. H.:

Oxygen, nitrogen, recovery and radiation therapy.

In: Cellular Radiation Biology, Williams and Wilkins, Baltimore (1965)

Evans, R. G.; Bagshaw, M. A.; Gordon, L. F.; Kurkjian, S. D.;

Hahn, G. M.:

Modification of recovery from potentially lethal X-ray damage in plateau phase chinese hamster cells. .

Rad. Res. 59: 597 - 605 (1974)

Evans, R. G.:

What is the relevance of repair and time between fractions in multiple daily fractions per day radiotherapy.

Brit. J. of Radiology 57: 538 - 541 (1984)

Gray, L. H.:

The initiation and development of cellular damage by ionizing radiations.

Brit. J. of Radiology 26: 609 618 (1953)

- Gray, L. H.; Conger, A. D.; Ebert, M.; Hornsey, S.;  
Scott, O. C. A.:  
The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time  
of irradiation as a factor in radiotherapy.  
Brit. J. of Radiology 26: 638 - 648 (1953)
- Hahn, G.; Rockwell, S.; Kallman, R. F.; Gordon, L. F.;  
Frindel, E.:  
Repair of potentially lethal damage in vivo in solid tumour  
cells after X-irradiation.  
Cancer Res. 34: 351 (1974)
- Hall, E. J.:  
Radiobiology for the Radiologist  
2nd edition, Harper and Row, Philadelphia (1982)
- Hetzel, F. W.; Kruuv, J.; Frey, H. E.:  
Repair of potentially lethal damage in X-irradiated  
V 79 cells.  
Rad. Res. 68: 308 - 319 (1976)
- Hirst, D. G.; Hazlehurst, J. L.; Brown, J. M.:  
The effect of alterations in haematocrit on tumour  
sensitivity to X-rays.  
Int. J. Radiat. Biol. 46: 345 - 354 (1984)
- Holthusen, H.:  
Beiträge zur Biologie der Strahlenwirkung. Untersuchungen  
an Askarideneiern.  
Pflügers Archiv ges. Physiol. 187: 1 - 24 (1921)
- Kiefer, J.:  
Biologische Strahlenwirkung.  
Springer, Berlin (1981)
- Köpf, R.; Kummermehr, J.:  
Bestimmung der Zelldichte in experimentellen Mäuse-  
tumoren.  
Jahresbericht der Arbeitsgruppe experimentelle Tumorthherapie  
GSF, Neuherberg (1983)
- Kummermehr, J.; Trott, K.-R.:  
Sensitization of a transplantable murine fibrosarcoma by  
partial synchronization with hydroxyurea.  
Radiolog. Res. and Radiotherapy IAEA, Wien 1: 427 - 442  
(1977)

Kummermehr, J.; Fink, R.; Preuß-Bayer, G.; Trott, K.-R.:  
Reoxygenierung in einem transplantablen Fibrosarkom  
der Maus.

Strahlentherapie 157: 272 - 276 (1981)

Laval, F.; Huet, J.:

Influence of poly(ADP-ribose) synthesis inhibitors on the  
repair of sublethal and potentially lethal damage in  
-irradiated mammalian cells.

Int. J. Radiat. Biol. 47: 655 - 662 (1985)

Little, J. B.; Hahn, G. M.; Frindel, E.; Tubiana, M.:

Report of potentially lethal damage in vitro and in vivo.  
Radiology 106: 689 - 694 (1973)

Manz, R.; Otte, J.; Thews, G; Vaupel, P.:

Relationship between size and oxygenation status of  
malignant tumours.

Adv. exp. med. biol. (in press)

McNally, N. J.:

A comparison to the effects of radiation on tumour  
growth delay and cell survival. The effect of oxygen.

Brit. J. of Radiology 46: 450 - 455 (1973)

McNally, N. J.; Sheldon, P. W.:

The effect of radiation on tumour growth delay, cell survival  
and cure of the animal using a single tumour system.

Brit. J. of Radiology 50: 321 - 328 (1977)

McNally, N. J.; de Ronde, J:

Radiobiological studies of tumours in situ compared with  
cell survival.

Brit. J. Cancer 41: 259 - 265 (1980)

Michael, B. D.; Harrop, H. A.:

Time scale and mechanism of radiosensitization and radio-  
protection at the cellular level.

In: Brady, L. W. (ed.): Clinical Management of Cancer,  
Masson, New York (1980)

Mottram, J. C.:

A factor of importance in the radiosensitivity of tumours.

Brit. J. of Radiology 9: 606 - 614 (1936)

Moulder, J.; Rockwell, S.:

Hypoxic fractions of solid tumours: experimental techniques, methods of analysis and a survey of existing data.

Int. J. Rad., Oncol., Biol., Phys. 10: 695 - 712 (1984)

Müller-Klieser, W.; Vaupel, P.:

Die Sauerstoffversorgung maligner Tumoren als kritischer Parameter der Therapie.

Mikrozirk. Forsch. Klin. 2: 91-106

Karger, Basel (1983)

Müller-Klieser, W.; Vaupel, P.; Manz, R.; Grunewald, W. A.:

Intracapillary oxyhemoglobin saturation in malignant tumours with central or peripheral blood supply.

Eur. J. Cancer 16: 195 - 201 (1980)

Müller-Klieser, W.; Vaupel, P.; Manz, R.; Schmidseider, R.:

Intracapillary oxyhemoglobin saturation of malignant tumours in human.

Int. J. Rad., Oncol., Biol., Phys. 7: 1397 - 1404 (1981)

Müller-Klieser, W.; Manz, R.; Otte, J.; Vaupel, P.:

Tissue oxygenation in solid tumours from different cell lines at the same implantation site.

12th European Conference on Microcirculation, Jerusalem (1982)

Müller-Klieser, W.; Sutherland, R. M.:

Influence of convection in the growth medium on oxygen tensions in multicellular tumour spheroids.

Cancer Res. 42: 237 - 242 (1982)

Otte, J.; Manz, R.; Müller-Klieser, W.; Vaupel, P.:

Impact of the implantation site on the tumour oxygenation.

12th European Conference on Microcirculation, Jerusalem (1982)

Pohlit, W.; Heyder, I. R.:

The shape of dose-survival curves for mammalian cells and repair of potentially lethal damage analyzed by hypertonic treatment.

Rad. Res. 87: 613 - 634 (1981)

- Puck, T. T.; Markus, P. I.; Ciecuira, S. J.:  
Clonal growth of mammalian cells in vitro.  
J. exp. Med. 103: 273 - 283 (1956)
- van Putten, L. M.; Kallman, R. F.:  
Oxygenation status of a transplantable tumour during  
fractionated radiation therapy.  
J. Nat. Cancer Inst 40: 441 - 451 (1968)
- Rasey, J. S.; Nelson, N. J.; Carpenter, R. E.:  
Recovery from potentially lethal damage following irradiation  
with X-rays or cyclotron neutrons.  
Int. J. Rad., Oncol., Biol., Phys. 4: 1023 - 1027 (1978)
- Read, J.: The effect of ionizing radiations on the broad bean  
root. Part X: The dependence of the X-ray sensitivity on  
dissolved oxygen.  
Brit. J. Radiol. 25: 89-99 (1952)
- Reinhold, H. S.:  
A cell dispersion technique for use in quantitative  
transplantation studies with solid tumours.  
Europ. J. Cancer 1: 67-71 (1965)
- Rockwell, S.:  
In vivo-in vitro tumour systems:  
New models for studying the response of tumours to therapy.  
Laboratory animal science 27: 831 - 851 (1977)
- Schwarz, G.:  
Über Desensibilisierung gegen Röntgen- und Radiumstrahlen.  
Münch. med. Wschr. 56: 1217 - 1218 (1909)
- Sheldon, P. W.; Fowler, J. F.:  
The effect of recovery from potentially lethal damage on the  
determination of repair and repopulation in a murine tumour.  
Brit. J. of Radiology 58: 151 - 160 (1985)
- Shipley, W. U.; Stanley, J. A.; Courtenay, V. D.;  
Field, S. B.:  
Repair of radiation damage in Lewis lung carcinoma cells  
following in situ treatment with fast neutrons and  $\gamma$ -rays.  
Cancer Res. 35: 932 (1975)

Thomlinson, R. H.; Gray, L. H.:

The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy.

Brit. J. Cancer 9: 539 - 549 (1955)

Thomlinson, R. H.:

Changes of oxygenation in tumours in relation to irradiation.

Front. Radiation Ther. Onc. 3: 109 - 121 (1968)

Trott, K.-R.:

Strahlenwirkungen auf die Vermehrung von Säugetierzellen.

In: Handbuch der medizinischen Radiologie, Bd. II, Teil 3,

Springer, Berlin (1972)

Trott, K.-R.:

Die Bedeutung der Besonderheiten der Tumorzirkulation für die Strahlentherapie.

In: Vaupel, P.; Hammersen, F.:

Mikrozirkulation in malignen Tumoren

Karger, Basel: 114-122 (1983)

Urano, M.; Nesumi, N.; Ando, A.; Koike, S.; Ohnuma, N.:

Repair of potentially lethal radiation damage in a spontaneous animal tumour in vivo.

Radiology 118: 447 - 451 (1976)

Urtasun, R.; Band, P.; Chapman, J. D.; Feldstein, M. C.;

Mielke, B.; Fryer, C.:

Radiation and high-dose metronidazole in supratentorial glioblastomas.

New Eng. J. Med. 294: 1364 - 1367 (1976)

Vaupel, P.:

Atemgaswechsel und Glukosestoffwechsel von Implantations-tumoren (DS-Carcinosarkom) in vivo.

In: Thews (Hrsg): Funktionsanalyse biologischer Systeme,

Steiner, Wiesbaden (1974)

Vaupel, P.:

Oxygen supply to the malignant tumours.

In: Peterson (ed.): Tumour Blood Circulation, CRC Press,

Boca Raton (1979)

Withers, H. R.; Peters, L.:

Basic principles of radiotherapy.

In: Fletcher, G. (ed.): Textbook of Radiotherapy, Lea and Febinger, Philadelphia (1980)

Wright, E. A.; Howard-Flanders, P.:

The influence of oxygen on the radiosensitivity of mammalian tissues.

Acta Radiol. 48: 26 - 32 (1957)

Zinninger, G. F.; Little, J. B.:

Fractionated radiation response of human cells in stationary and exponential phases of growth.

Radiology 108: 423 - 428 (1973)



Herrn Prof. Dr. Dr. U. Hagen und Herrn Prof. Dr. K.-R. Trott danke ich für die Anregung und Betreuung der Arbeit. Die experimentellen Untersuchungen wurden im Institut für Strahlenbiologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung durchgeführt. Der Institutsleitung und der Geschäftsführung sei für die Bereitstellung von Mitteln und Raum gedankt.



## Lebenslauf

|                 |                                                                                           |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Geburtsdatum    | 21.2.1956                                                                                 |
| Geburtsort      | München                                                                                   |
| Familienstand   | ledig                                                                                     |
| Eltern          | Franz Hofner<br>Maria Hofner, geb. Beck                                                   |
| Schulausbildung | Abitur<br>am Bertolt-Brecht-Gymnasium, München<br>25.6.1976                               |
| Studium         | Biologie<br>Ludwig-Maximilian-Universität,<br>München<br>Diplom 21.2.1983<br>Diplomarbeit |

## Wissenschaftliche Tätigkeit

Veröffentlichung:  
Cytochrome b of revertants in yeast  
(zusammen mit G. Burger)  
Eur. J. Biochem. 142: 299-304 (1984)  
Von 1.1.1983 bis 31.12.1985 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Strahlenbiologie,  
seit 1.1.1986 Biologin in der Abteilung Technischer Strahlenschutz,  
Projekt Radioökologie in der Gesellschaft für Strahlen-und Umweltforschung, Neuherberg









